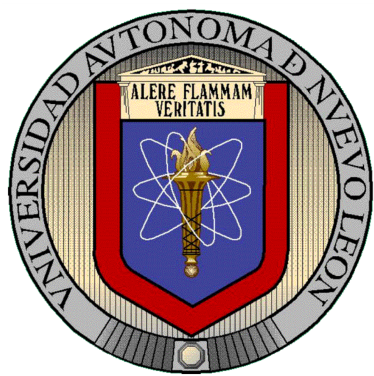


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE
Curcuma longa Y *Berberis vulgaris* INCORPORADOS EN NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTRA PROTOZOARIOS DE INTERÉS CLÍNICO**

Por

ALEJANDRA PACHECO ORDAZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación en
Química de Productos Naturales

Marzo, 2018

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE
Curcuma longa Y *Berberis vulgaris* INCORPORADOS EN NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTRA PROTOZOARIOS DE INTERÉS CLÍNICO**

Comité de Tesis

Presidente: Dr. Abelardo Chávez Montes

Secretario: Dra. María Julia Verde Star

Vocal: Dr. Eduardo Sánchez García

Vocal: Dra. Azucena González Horta

Vocal: Dra. Adriana Núñez González

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE
Curcuma longa Y *Berberis vulgaris* INCORPORADOS EN NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTRA PROTOZOARIOS DE INTERÉS CLÍNICO**

Dirección de Tesis

Director: Dr. Abelardo Chávez Montes

Director externo: Dra. Magda Elizabeth Hernández García

Asesor externo: Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más grande agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que contribuyeron de una u otra manera en la realización de este proyecto.

A la UANL y Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme apoyo con una beca, sin la cual mis estudios no hubieran sido posibles.

A mi asesor y estimado amigo el Dr. Abelardo Chávez, que nada hubiese sido posible sin su guía y apoyo incondicional, además de brindarme la gran oportunidad de realizar este proyecto y confiar en mí para formar parte de su equipo.

A mi asesora externa Dra. Magda Hernández y al Centro de Investigación Biomédica del IMSS, por su asesoramiento, por hacer disponibles sus instalaciones y brindarme todo el apoyo necesario para que el proyecto se llevara a cabo.

A los miembros del comité, Dra. María Julia Verde, Dra. Adriana Núñez, Dra. Azucena González, Dr. Eduardo Sánchez y Dra. Osvelia Rodríguez, gracias por sus consejos, asesoramiento y dedicar su tiempo en apoyarme en este proyecto.

A todos los profesores que formaron parte de mi formación en la maestría, cada uno con sus diferentes enseñanzas complementaron los conocimientos que ahora me llevo. Dr. Ezequiel Viveros, Dr. Ramiro Quintanilla, Dra. Julia Verde, Dra. Catalina Rivas, Dra. Azucena Oranday, Dra. Eufemia Morales, Dra. Ledy García, Dr. Roberto Mercado, Dr. Ramón Rodríguez, Dr Carlos Aguilera y Dr. Carlos Hernandez, muchas gracias por su tiempo, apoyo, consejos y valiosas enseñanzas.

Al Maestro Sergio García, que siempre estuvo disponible para apoyarnos en lo que fuese necesario. Gracias por compartir sus conocimientos.

Al Dr. Edgar García de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, por permitirme usar su equipo de MEB y junto con su tiempo y apoyo haber podido completar una parte importante de este proyecto.

A mis queridos compañeros en el Laboratorio de Química Analítica, Joel Elizondo, David Marín, Teresa Campos, Lizeth Monreal, Aria Barrera, Misael López, Sonia López, y Mizaël Ortiz, quienes estuvieron en las buenas y en las malas durante estos dos años y siempre dispuestos a ayudar.

Y por último, pero no por eso menos importante, a mi esposo Matthew Castellon y toda mi familia que sin su amor, paciencia y apoyo incondicional no hubiera podido llevar a cabo mis estudios.

ÍNDICE

Sección	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Parasitosis	3
2.1.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	3
2.1.2. <i>Trichomonas vaginalis</i>	5
2.1.3 Tratamiento	7
2.2. Productos Naturales y parasitosis	9
2.2.1. <i>Berberis vulgaris</i>	10
2.2.2. <i>Curcuma longa</i>	13
2.3. Sistemas nanométricos acarreadores de fármacos	16
2.3.1. Preparación de nanopartículas poliméricas	19
2.3.2. Extractos incorporados en nanopartículas poliméricas	22
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	26
5.1. Objetivo general	26
5.2. Objetivos particulares	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27

6.1. Material vegetal	27
6.2. Cepas	27
6.2.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	27
6.2.2. <i>Trichomonas vaginalis</i>	27
6.3. Preparación del medio basal TYI-S-33	27
6.4. Preparación del suero bovino	28
6.5. Cinéticas de crecimiento	28
6.6. Mantenimiento de las cepas	29
6.7. Extracción del material vegetal	30
6.7.1. <i>Berberis vulgaris</i>	30
6.7.2. <i>Curcuma longa</i>	30
6.8. Rendimiento de los extractos	31
6.9. Identificación parcial de grupo funcionales	31
6.9.1. Prueba de Liebermann-Burchard	31
6.9.2. Prueba de Dragendorff	31
6.9.3. Prueba de Baljet	32
6.9.4. Prueba de NaOH	32
6.9.5. Prueba de cloruro férrico	32
6.9.6. Prueba de 2,4-dinitrofenilhidracina	32
6.9.7. Prueba del KMnO_4	32
6.9.8. Prueba de Shinoda	33

6.9.9. Prueba de Saponinas	33
6.9.10. Prueba de la Antrona	33
6.10. Concentración de activo presente en el extracto	33
6.10.1. Barrido de absorción	34
6.10.2. Curva de calibración	34
6.10.3. Cuantificación de los activos presentes en los extractos	35
6.11. Preparación de las diluciones de los extractos	35
6.12. Preparación de nanopartículas poliméricas con extracto	36
6.13. Caracterización de las formulaciones de nanopartículas	36
6.13.1. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI)	36
6.13.2. Morfología de las nanopartículas	37
6.13.3. Identificación de fracciones atrapadas en las nanopartículas	37
6.13.4. Eficiencia de atrapamiento del activo en el sistema nanoparticulado	38
6.13.4.1. Barrido de absorción	38
6.13.4.2. Curva de calibración	38
6.13.4.3. Cuantificación de los activos atrapados	39
6.14. Ensayo biológico	39
6.15. Análisis estadístico	40
7. RESULTADOS	41
7.1. Obtención de los extractos y rendimiento	41

7.2. Identificación parcial de grupos funcionales	41
7.3. Concentración de activo presente en el extracto crudo	42
7.3.1. Barrido de absorción	42
7.3.2. Curva de calibración	45
7.3.3. Cuantificación de activos presentes en sus extractos crudos	47
7.4. Estandarización de la obtención de nanopartículas	47
7.5. Caracterización de las formulaciones de nanopartículas	50
7.5.1. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI)	50
7.5.2. Morfología de las nanopartículas	52
7.5.3. Identificación de fracciones incorporadas en las nanopartículas	53
7.5.4. Eficiencia de encapsulación del sistema nanoparticulado	55
7.6. Cinéticas de crecimiento	57
7.7. Ensayo biológico	58
8. DISCUSIÓN	61
9. CONCLUSIÓN	70
10. BIBLIOGRAFÍA	71

ÍNDICE DE TABLAS

- 11. Tabla 1. Taxonomía de *B. vulgaris*.
- 14. Tabla 2. Taxonomía de *C. longa*.
- 28. Tabla 3. Composición del medio TYI-S-33.
- 41. Tabla 4. Porcentaje de rendimiento en peso seco de los extractos de *C. longa* y *B. vulgaris*.
- 42. Tabla 5. Identificación química de grupos funcionales presentes en los extractos de *C. longa* y *B. vulgaris*. Se representa con + el resultado positivo y con – el resultado negativo de acuerdo a cada prueba.
- 47. Tabla 6. Estimación de la concentración de curcumina en el extracto etanólico crudo de *C. longa*.
- 47. Tabla 7. Estimación de la concentración de berberina en el extracto metanólico crudo de *B. vulgaris*.
- 50. Tabla 8. Tamaño de partícula y PDI de cada extracto incorporado en nanopartículas con polímero Eudragit® EPO.
- 59. Tabla 11. Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) para cada extracto libre, extracto incorporado en nanopartículas y metronidazol contra *T. vaginalis*.
- 59. Tabla 12. Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) para cada extracto libre, extracto incorporado en nanopartículas y metronidazol contra *E. histolytica*.
- 60. Tabla 13. Comparación de los límites inferior y superior de cada tratamiento.

ÍNDICE DE FIGURAS

4. Figura 1. Ciclo biológico de *E. histolytica*.
6. Figura 2. Ciclo biológico de *T. vaginalis*.
7. Figura 3. Estructura química del fármaco metronidazol.
8. Figura 4. Estructura química del fármaco tinidazol.
12. Figura 5. Estructuras de los principales alcaloides que contiene la planta *B. vulgaris*.
14. Figura 6. Estructura química de curcumina.
17. Figura 7. Los sistemas nanoscópicos son mayores que las moléculas típicas y algunos más pequeños que los virus. En su tamaño son similares a muchas proteínas lo que constituye una de las razones por las que pueden interactuar en el interior de las células.
18. Figura 8. Representación esquemática de nanoesferas y nanocápsulas: a) principio activo retenido en la matriz polimérica de las nanoesferas; b) principio activo adsorbido o disperso molecularmente en la matriz polimérica de las nanoesferas c) principio activo adsorbido en la pared polimérica de las nanocápsulas d) principio activo disuelto en el núcleo oleoso de la nanocápsulas.
20. Figura 9. Técnica de nanoprecipitación.
21. Figura 10. Estructuras químicas de Eudragit®.
43. Figura 11. Espectro de absorción de radiación electromagnética UV/Vis del extracto etanólico de *C. longa* a 20 ppm disuelto en metanol.
43. Figura 12. Espectro de absorción de radiación electromagnética UV/Vis de solución metanólica de curcumina a 6 ppm.
44. Figura 13. Espectro de absorción de radiación electromagnética UV/Vis del extracto metanólico de *B. vulgaris* a 20 ppm disuelto en metanol.

44. Figura 14. Espectro de absorción de radiación electromagnética UV/Vis de una solución metanólica de cloruro de berberina a 6 ppm.
45. Figura 15. Regresión lineal de la curva de calibración de curcumina por espectrofotometría a una λ de 421 nm. En la gráfica se muestran los valores de la ecuación de la recta ($y=mx+b$), donde la pendiente es de 0.2219, una intersección de 0.3575 y un coeficiente de correlación de 0.9955 (n=3).
45. Figura 16. Regresión lineal de la curva de calibración de cloruro berberina por espectrofotometría a una λ de 349 nm. En la gráfica se muestran los valores de la ecuación de la recta ($y=mx+b$), donde la pendiente es de 0.7078, una intersección de 0.0034 y un coeficiente de correlación de 0.99505 (n=3).
46. Figura 17. Regresión lineal de la curva de calibración del extracto metanólico crudo de *B. vulgaris* por espectrofotometría a una λ de 349 nm. En la gráfica se muestran los valores de la ecuación de la recta ($y=mx+b$), donde la pendiente es de 0.0234, una intersección de 0.0047 y un coeficiente de correlación de 0.99955 (n=3).
46. Figura 18. Regresión lineal de la curva de calibración del extracto metanólico crudo de *B. vulgaris* por espectrofotometría a una λ de 226 nm. En la gráfica se muestran los valores de la ecuación de la recta ($y=mx+b$), donde la pendiente es de 0.0347, una intersección de 0.0485 y un coeficiente de correlación de 0.99581 (n=3).
48. Figura 19. Tamaño de partícula en función del volumen de fase acuosa utilizada de suspensión, sobrenadante y pastilla. Método de nanoprecipitación con 50 mg del polímero Eudragit® EPO y 5 mL de metanol (n=3).
48. Figura 20. Índice de polidispersidad en función del volumen de fase acuosa utilizada de suspensión, sobre nadante y pastilla. Método de nanoprecipitación con 50 mg del polímero Eudragit® EPO y 5 mL de metanol (n=3).

49. Figura 21. Tamaño de partícula en función del volumen de fase acusa utilizada de suspensión, sobrenadante y pastilla. Método de nanoprecipitación con 50 mg del polímero Eudragit® EPO y 5 mL de acetona (n=3).
49. Figura 22. . Índice de polidispersidad en función del volumen de fase acusa utilizada de suspensión, sobre nadante y pastilla. Método de nanoprecipitación con 50 mg del polímero Eudragit® EPO y 5 mL de acetona (n=3).
51. Figura 23. Determinación del tamaño de partícula y PDI por espectroscopía de correlación fotónica de las NPP de extracto de *C. longa* incorporado en polímero Eudragit ® EPO.
51. Figura 24. Determinación del tamaño de partícula y PDI por espectroscopía de correlación fotónica de las NPP de extracto de *B. vulgaris* incorporado en polímero Eudragit ® EPO.
52. Figura 25. Imagen obtenida por MEB de NPP con extracto etanólico de *C. longa* incorporado. Se muestra la morfología y el tamaño de partícula.
52. Figura 26. Imagen obtenida por MEB de NPP con extracto etanólico de *C. longa* incorporado. Se muestra la morfología con tendencia a esfera.
53. Figura 27. Imagen obtenida por MEB de NPP con extracto metanólico de *B. vulgaris* incorporado. Se muestra la morfología y el tamaño de partícula.
53. Figura 28. Imagen obtenida por MEB de NPP con extracto etanólico de *B. vulgaris* incorporado. Se muestra la morfología con tendencia a esfera observando una población de partículas con tamaños homogéneos.
54. Figura 29. Cromatografía de capa fina: a) Cloruro de berberina, b) Extracto crudo de *B. vulgaris*, c) Fracción atrapada en la formulación de *B. vulgaris* en nanopartículas.
55. Figura 30. Cromatografía de capa fina: a) Curcumina, b) Extracto crudo de *C. longa*, c) Fracción atrapada en la formulación de *C. longa* en nanopartículas.

58. Figura 31. Cinética de crecimiento de *E. histolytica* inoculando 20,000 trofozoítos en 5 mL de medio basal TYI-S-33 adicionado con 10% de suero bovino a 36.5°C.
58. Figura 32. Cinética de crecimiento de *T. vaginalis* inoculando 100,000 trofozoítos en 5 mL de medio basal TYI-S-33 adicionado con 10% de suero bovino a 36.5°C.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
A	Absorbancia
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>et al.</i>	Y colaboradores
g	Gramo
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
kg	Kilogramo
KMnO ₄	Permanganato de potasio
lb	Libra
MEB	Microscopía electrónica de barrido
mg	Miligramo
mg/mL	Miligramos por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N	Normal
n=3	Realizado por triplicado
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanometros
NPP	Nanopartículas poliméricas
p/p	Peso sobre peso
PDI	Índice de polidispersidad
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
Rf	Factor de retención
rpm	Revoluciones por minuto

TYI-S-33	Suero tripticasa extracto de levadura hierro
UV/Vis	Ultravioleta/visible
v/v	Volumen sobre volumen
λ	Longitud de onda
λ_{max}	Longitud de onda máxima
μL	Microlitro

RESUMEN

Los parásitos protozoarios *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, son de gran interés clínico debido a su incidencia a nivel mundial, sobre todo en países en vías de desarrollo. Estos protozoarios, infectan a un gran porcentaje de la población mundial. *E. histolytica* es responsable de causar enfermedades gastrointestinales y abscesos hepáticos mientras que *T. vaginalis* causa vaginosis. El principal tratamiento para estas enfermedades infecciosas es la administración de Metronidazol. Se ha comprobado que estos parásitos han desarrollado resistencia a este fármaco. Esto conlleva a la necesidad de elevar la dosis y la duración del tratamiento, haciendo que el fármaco presente efectos secundarios no deseados obligando al paciente a suspender su tratamiento. Es por eso la importancia de encontrar fuentes nuevas con compuestos que trabajen como agentes antiparasitarios. Las plantas representan una fuente importante y diversidad de biomoléculas con estas propiedades. En este estudio se trabajó con el extracto etanólico de rizoma de *Curcuma longa* y el extracto metanólico de raíz de *Berberis vulgaris*. Se investigó una estrategia diferente para la presentación de activos con sistemas de administración que mejoran el desempeño de los tratamientos farmacológicos. Los extractos fueron caracterizados parcialmente e incorporados independientemente en nanopartículas poliméricas, siendo éstas un sistema de administración que ha mostrado ventajas en la biodisponibilidad del activo que contiene. Se caracterizaron las formulaciones de nanopartículas y se determinó su actividad antiparasitaria *in vitro* mediante cálculos de la concentración inhibitoria media (CI₅₀). Por lo tanto, la presente investigación contempla la evaluación y validación de los extractos vegetales como agentes antiparasitarios y, su potencial incremento de la actividad biológica con su administración en un sistema polimérico nanoparticulado.

ABSTRACT

The protozoan parasites *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis* have been of great clinical interest due to their incidence worldwide, especially in developing countries. These protozoans infect a large percentage of the world's population. *E. histolytica* is responsible for causing gastrointestinal diseases and hepatic abscesses, while *T. vaginalis* causes vaginosis. The main treatment for these infectious diseases is the administration of Metronidazole. It has been proven that these parasites have developed resistance to this drug. This necessitates an increase in the treatment's dosage and duration, causing the drug to present unwanted side effects, and often forcing the patient to suspend the treatment. Therefore, it is of critical importance to find novel sources of active compounds with anti-parasitic activities. Plants represent an important source and diversity of biomolecules with these proprieties. In this study, we worked with the ethanolic extract of the rhizome from *Curcuma longa*, and the methanolic extract of the root from *Berberis vulgaris*. A different strategy was investigated to present the active compounds with delivery systems that can improve the pharmacological treatments. The extracts were partially characterized and independently incorporated into polymeric nanoparticles, which present the active compounds with a delivery system that improve their bioavailability. The nanoparticles formulations were characterized, and the *in vitro* anti-parasitic activity was determined by calculating the Median Inhibitory Concentration (IC₅₀). This study contemplates the evaluation and validation of these plant extracts as anti-parasitic agents, and the potential increase of their biological activity when administrated in nanoparticulate delivery systems.

1. INTRODUCCIÓN

La parasitosis es un problema de salud pública mundial a causa de la magnitud con que se presenta; así mismo, su trascendencia está ligada a enfermedades secundarias. Algunos de los parásitos protozoarios de interés clínico son *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica*. *T. vaginalis* es uno de los patógenos de transmisión sexual no virales mas prevalentes del mundo; se estiman 248 millones de casos nuevos al año (OMS, 2012). Después de colonizar, este parásito causa vaginitis, uretritis y prostatitis (Petrin et al., 1998). Además, el patógeno se ha asociado con otras consecuencias graves como resultados adversos del embarazo y partos prematuros (Kleban et al., 2001), infertilidad (Grodstein et al., 1993), predisposición para cáncer cervical (Viikki et al., 2000) y enfermedad pélvica inflamatoria (Cherpes et al., 2006). Evidencias han demostrado el potencial que tiene *T. vaginalis* como cofactor para aumentar la transmisión de HIV (Ghys et al., 1995). *E. histolytica* es un patógeno humano que coloniza principalmente el intestino grueso por medio de contaminación fecal-oral y también se ha descrito la transmisión sexual mediante el contacto anal-oral. Su prevalencia aumenta en zonas geográficas con saneamiento ambiental inadecuado, tal como ocurre en países en vías de desarrollo (Reyes et al., 2003). Se estima que el 10% de la población mundial está infectada presentando aproximadamente 100.000 muertes anuales. Existen 500 millones de nuevas infecciones por año, de las cuales 50 millones padecen amebiasis invasiva, lo que significa que la manifestación es intestinal y extraintestinal (hígado, pulmón, peritoneo, cerebro, genitales y pericardio) (OMS, 2011).

Por décadas, el tratamiento para infecciones parasitarias por protozoos ha sido el metronidazol entre otros nitroimidazoles. Sin embargo, ya está bien establecido que el uso extensivo de este regimen de tratamiento monoterapéutico fomenta resistencia al fármaco, y esto conduce a tratamientos no exitosos y recaídas de la enfermedad. Recientemente, se ha observado resistencia al metronidazol en *T. vaginalis*, y se ha sugerido en *E. histolytica* debido al aumento de la frecuencia de tratamientos no exitosos (Barratt et al. 2013). Así mismo, el uso de este fármaco frecuentemente presenta efectos secundarios que obligan a que el paciente abandone el tratamiento. Debido a esto, aumenta la necesidad de identificar nuevos compuestos con actividad antiprotozoaria y las plantas representan una

fuente importante y diversidad de biomoléculas con propiedades únicas y muchos de estos compuestos son atractivos candidatos para el desarrollo de nuevos agentes antiparasitarios.

La cúrcuma es el rizoma de la planta *Curcuma longa*. Curcumina, es uno de los once curcuminoides identificados por métodos analíticos y el más abundante, el cual ejerce una variedad de efectos biológicos bien documentados los cuales incluyen antioxidante, antiinflamatorio, antigenotóxico, antitumoral, actividad antibacteriana, antifúngica y recientemente, actividad antiprotozoaria *in vitro*.

Berberis vulgaris es un arbusto de la familia Berberidaceae que ha sido utilizado medicinalmente en diferentes sistemas de medicina tradicional desde hace mas 3,000 años. El compuesto mas abundante es la berberina, un alcaloide isoquinoléico el cual ha sido utilizado para tratar diarrea y desordenes gastrointestinales, tiene múltiples efectos farmacológicos incluyendo actividad antimicrobiana contra 54 microorganismos (Amin et al., 1969), inhibición de la secreción intestinal de iones y de la contracción del músculo liso, inhibición de taquiarritmias ventriculares, antiinflamatorio, estimulación de la secreción de bilis y para desecho de bilirrubina y en estudios recientes se le ha demostrado su gran potencial antiprotozoario.

Además de validar extractos vegetales como nuevos antiparasitarios, la importancia de este estudio es la formulación y caracterización de diferentes sistemas de administración para optimizar la actividad de dichos extractos mediante su incorporación en nanopartículas poliméricas (NPP). Dentro de los objetivos que se pueden alcanzar empleando nanopartículas cargadas con moléculas terapéuticas destacan, el mejorar la estabilidad físicoquímica de los principios activos encapsulados, aumentar la absorción de moléculas activas, actuar como sistemas de liberación controlada, alcanzar tejidos/barreras específicas y penetrar células inalcanzables por principios activos convencionales, disminuir los efectos adversos y toxicidad asociada a la administración de fármaco libre, otorgar protección de la molécula encapsulada, por ejemplo, contra la degradación enzimática, química o inmunológica.

2. ANTECEDENTES

2.1. Parasitosis

Las enfermedades causadas por protozoarios son responsables de una considerable morbilidad y mortalidad en todo el mundo, especialmente en países en vía de desarrollo. Entre de los parásitos protozoarios de gran interés clínico se encuentran *T. vaginalis* y *E. histolytica*. *T. vaginalis* causa la infección por transmisión sexual no viral mas común del mundo, se estima que alrededor de 8.1% mujeres y 1.0% de hombres están infectados (OMS, 2001) y debido a que no es una enfermedad reportable, la Organización Mundial de la Salud estima que hubo 276.4 millones de casos en 2008 y alrededor del 90% de estas infecciones ocurrieron en personas viviendo en condiciones de bajos recursos (OMS, 2008). *E. histolytica* es un parásito intestinal, agente etiológico de la amebiasis, enfermedad la cual tiene amplia distribución mundial con 10% de la población infectada y causante de unas 100,000 muertes anuales (OMS, 2011). En México, la amibiasis se encuentra entre las primeras 20 causas de morbilidad (Ximénez et al., 2009) y su prevalencia puede ser hasta del 50% en zonas de Centro y Sudamérica, Africa y Asia. (OMS, 1997).

En el Boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud en México se reportan en el año 2016, 47,009 casos de tricomoniasis urogenital y en el 2017 hasta la semana 38, se reportaron 1,764 casos en hombres y 33,674 casos en mujeres, dando un total de 35, 438 casos. Así mismo, en el año 2016 se reportaron 168,516 casos de amebiasis intestinal y 413 casos de absceso hepático amebiano. En el 2017, hasta la semana 38, se reportaron 170,392 casos de amebiasis intestinal y 384 casos de absceso hepático amebiano. A pesar de tener este registro, un gran número de casos no llegan a ser reportados.

2.1.1. *Entamoeba histolytica*

El único huésped natural conocido para *E. histolytica* es el cuerpo humano siendo el intestino grueso su principal órgano diana. *E. histolytica*, el cual es un protozoo cosmopolita anaeróbico/microaerofílico que presenta un ciclo de vida muy sencillo

(Figura 1) en donde los trofozoítos, forma invasiva (vegetativa), tienen un diámetro de 10-60 μm (rango más frecuente 12-15 μm), forma alargada, un núcleo con endosoma central y cromatina periférica fina, distribuida regularmente. Presentan movilidad direccional, progresiva, mediante la emisión de pseudópodos digitiformes explosivos (lobópodos). En el extremo posterior del organismo se encuentra el uroide, que contiene el motor de actina/miosina, el cual impulsa a la amiba hacia adelante. No es frecuente, pero pueden observarse eritrocitos fagocitados en el endoplasma. Emergen en el íleon terminal, tras el desenquistamiento, en la forma de trofozoítos con 4 núcleos, que darán lugar a 8 trofozoítos uninucleados. La multiplicación se lleva a cabo por división binaria. Los quistes, infectantes, son esféricos y miden 10-15 μm . Presentan, según su grado de madurez, de uno a cuatro núcleos con las mismas características del trofozoíto, cuerpos cromatoidales de bordes curvos y una masa de glucógeno cuando son inmaduros. Quistes y trofozoítos son eliminados en las heces fecales. Los vehículos principales de transmisión son el agua y alimentos contaminados con quistes. Los trofozoítos pueden ser infectantes en la práctica de sexo anal, lesiones de continuidad en piel (a través de pañales contaminados, lesiones perigenitales). Deben considerarse también los fomites (monedas, billetes, juguetes, etcétera) y los artrópodos, vectores mecánicos (Makiuchia y Nozaki, 2014).

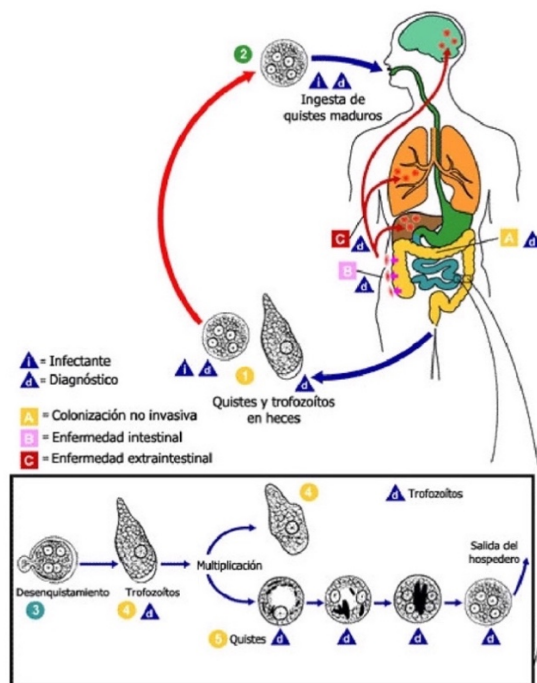


Figura 1. Ciclo biológico de *E. histolytica* (CDC, 2017).

Los síntomas presentados en amebiasis son pérdida de peso, dolor abdominal, disentería, heces sanguinolentas y fiebre. Si no se trata a tiempo, los trofozoítos pueden invadir además del intestino grueso, otros órganos como el hígado, cerebro, pulmones y en casos severos puede causar la muerte del hospedero (Guerrant, 1986).

Una vez concretado el desenquistamiento, *E. histolytica* tiene el potencial de reproducirse en el moco que recubre el intestino grueso mediante división binaria de los trofozoítos. Algunos parásitos serán eliminados con este moco en la forma de trofozoítos y/o quistes y otros alcanzarán las células del epitelio, las cuales serán destruidas, fagocitadas. La lesión típica que se produce son úlceras extendidas, en "cuello de botella" definidas por la extensión lateral de *E. histolytica* sobre la lámina basal. Si dicha lámina es penetrada, la invasión a torrente sanguíneo determinará la diseminación del parásito a otros órganos, principalmente a hígado, en la forma de abscesos, y con mucha menor frecuencia a pulmones, cerebro y otros tejidos. Ante una perforación, los trofozoítos también pueden propagarse a tejidos contiguos (Ralston y Petri, 2011).

2.1.2. *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis es un protozoario parasítico típicamente poliforme pero ocasionalmente con forma amibeoide, se encuentra extracelularmente en el epitelio del tracto genitourinario con una forma de vida principalmente anaerobia (Harp, 2011). Una célula de *T. vaginalis* mide 10–20 µm de largo y 2–14 µm de ancho. Tiene cuatro flagelos en la parte anterior de la célula y están libres, y un quinto flagelo que se dirige hacia la parte posterior del cuerpo celular asociado a la superficie celular formando una membrana ondulate que no tiene porción libre del flagelo. Un axostilo se extiende desde la parte posterior del organismo (Carlton et al., 2007). *T. vaginalis* es un parásito obligado depredador que fagocita bacteria, células epiteliales de vagina y eritrocitos, y que a su vez es ingerido por los macrófagos. *T. vaginalis* usa carbohidratos como su principal fuente de energía mediante metabolismo fermentativo bajo condiciones aerobias e anaerobias. El tiempo de incubación generalmente es de entre 4 y 28 días (Petrin et al., 1998)

T. vaginalis infecta principalmente el epitelio escamoso del tracto genital. Se replica por fisión binaria; en la mujer, reside en el tracto genital inferior y en el hombre, en la uretra, próstata y vesículas seminales. *T. vaginalis* es transmitido entre humanos, su único hospedador, principalmente por transmisión sexual (Figura 2). La infección persiste por largos periodos, posiblemente meses o años en mujeres, pero generalmente en hombres dura menos de 10 días (Krieger, 1995). El parásito no parece tener en su ciclo de vida una fase quística, por lo tanto no sobrevive en ambientes externos, sin embargo, puede sobrevivir afuera del cuerpo humano en un ambiente con agua por mas de tres horas (Burch et al. 1959). Sin embargo, puede existir una forma pseudoquística. Éstos han sido encontrados mas virulentos en animales y así podría tener relevancia para los humanos, particularmente en el caso de neoplasia (Afzan, 2012; Pereira-Neves et al. 2003). Evidencias de transmisión no sexual mediante fómites y posiblemente agua han sido descritas (Charles, 1991; Crucitti et al., 2011). *T. vaginalis* puede ser infectado con virus de RNA de doble cadena que pueden tener importantes implicaciones para su virulencia y patogénesis de la enfermedad (Goodman et al., 2011).

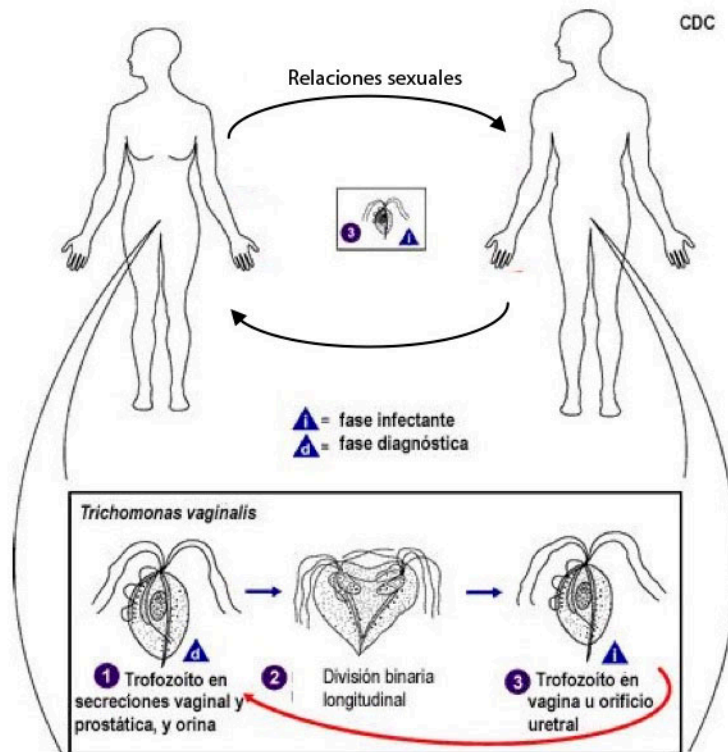


Figura 2. Ciclo biológico de *T. vaginalis* (CDC, 2017)

Los cuadros clínicos que causa, oscilan desde leves hasta muy severos. Esta enfermedad, en mujeres, produce una vulvovaginitis que puede dañar la uretra y el endocervix (García, 1993). Los sujetos de sexo masculino infectados habitualmente no presentan signos y síntomas (50 - 90%), aunque recientemente se ha reportado un mayor número de casos de uretritis no gonocócica (uretritis con descarga uretral clara o mucopurulenta y disuria) ocasionalmente aunado a epididimitis, e incluso a pequeñas ulceraciones en pene. También se han reportado prostatitis crónica, cáncer de próstata (Hawksworth et al., 2015), balanitis, infertilidad, ésta asociada al proceso inflamatorio e interferencia de la función de los espermatozoides, con baja motilidad y disminución en viabilidad. Aumenta la diseminación de virus viables, tales como el VIH, virus herpes simplex 2 (HSV-2), en hombres como en mujeres, lo que puede resultar en un aumento en la transmisión de estas enfermedades (Kissinger, 2013). La infección con *T. vaginalis* puede conducir a partos prematuros o incluso hasta abortos involuntarios en mujeres infectadas (Petrin et al., 1998).

2.1.3. Tratamiento

Nitroimidazoles son los fármacos de primera línea para el tratamiento de amebiasis y tricomoniasis, siendo el metronidazol (2-(2-Metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etanol) (Figura 3), el medicamento mas comúnmente utilizado a nivel mundial. Sin embargo, los fracasos del tratamiento en estas enfermedades han aumentado y el desarrollo de resistencia a metronidazol es motivo de preocupación (Jarrad et al., 2016).

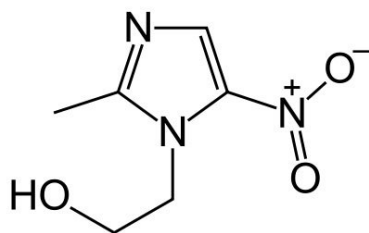


Figura 3. Estructura química del fármaco metronidazol.

En 2006, Schwebke y Barrientes realizaron un estudio en el cual aislaron de mujeres cepas de *T. vaginalis* para probar la susceptibilidad al metronidazol y tinidazol (1-(2-(Etilsulfonil)etil)-2-metil-5-nitro-1H-imidazol) (Figura 4), el cual es otro nitroimidazol utilizado para tratar diferentes infecciones protozoarias, mostrándose una resistencia del 9.6% y 0.56% respectivamente.

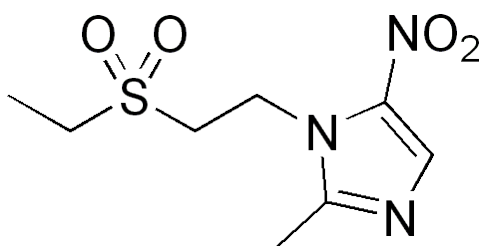


Figura 4. Estructura química del fármaco tinidazol.

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) considera como opción para el tratamiento de cepas de *T. vaginalis* resistentes al metronidazol, la administración de tinidazol, aunque, las infecciones resistentes son en el mayor de los casos, mas no siempre, tratadas con una terapia prolongada y a dosis mas altas de metronidazol. Este fármaco en la mayoría de los casos es bien tolerado, sin embargo, en un tratamiento con dosis altas y prolongado, causa efectos secundarios mas severos, entre ellos incluyen nausea, diarrea, sabor metálico en la boca en dosis normales, sin embargo, en dosis altas, causa el desarrollo de leucopenia y neutropenia. Además, se conoce que el metronidazol causa graves trastornos neurológicos y puede ser tóxico para el sistema nervioso central aparentemente sin importar la dosis y la duración del tratamiento (Kuriyama et al., 2011; Chacko, et al., 2011). Por el hecho de que metronidazol es mutagénico en bacterias y carcinogénico en ratones, ha llevado a un intenso debate sobre si es seguro para el tratamiento de mujeres embarazadas y finalmente a la contraindicación de este medicamento durante el primer trimestre del embarazo (Connor et al., 1977; Lindmark y Muller, 1976).

Los fracasos de los tratamientos de tricomoniasis con metronidazol aparecieron poco tiempo después de que este fármaco saliera al mercado hace 60 años (Liu et al., 2000), sin embargo, ya en la actualidad se presenta un aumento alarmante de estos casos fracasados

(Sobel et al., 1999). Mientras que hasta ahora, el metronidazol ha sido el principio activo de elección, altos índices de pruebas positivas en *T. vaginalis* han sido observados después de una sola dosis. Dado que *T. vaginalis* muestra ser altamente susceptible al metronidazol *in vivo* y la mayoría de las recurrencias en las pruebas positivas no son por reinfección, la evidencia sugiere que una sola dosis de metronidazol, no está siendo efectiva y los factores del hospedador pueden ser la causa (Kissinger, 2015).

En la práctica, el tratamiento es basado exclusivamente con 5-nitroimidazol, ya sea con metronidazol o tinidazol (Upcroft y Upcroft, 2001). Sin embargo, en algunas partes del mundo, como por ejemplo en Papúa Nueva Guinea, los índices de resistencia sobrepasan el 15% (Upcroft et al., 2009). En la mayoría de los casos la resistencia al metronidazol, puede ser solucionada con el aumento de la dosis o con sustituirlo por tinidazol (Sobel et al., 2001), pero no siempre es el caso (Goldman et al., 2009). Es por eso que la resistencia al metronidazol en *T. vaginalis* constituye un serio problema ya que regímenes de tratamiento alternativos son ineficientes (Leitsch et al., 2014).

A pesar de que metronidazol es uno de los medicamentos recomendados como el tratamiento de primera línea mas efectivo, tiene varios efectos secundarios (Mohammadzadeh et al. 2014). Por éstos efectos secundarios y contraindicaciones que presentan este tipo de medicamentos químicos, así como también las evidencias que existen sobre resistencia que están desarrollando los parásitos sobre éstos, el uso de diferentes plantas está siendo investigado para tratar parasitosis y ha sido posible encontrar un gran numero de metabolitos secundarios que presentan actividad antiprotozoaria.

2.2. Productos naturales y parasitosis

De acuerdo con las estadísticas proporcionadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), hoy en día el 80% de la población mundial usa drogas herbales para el tratamiento de diferentes enfermedades. Los productos naturales obtenidos de plantas medicinales son una gran fuente para producción de medicamentos y son la base de nuevos componentes activos en fármacos (Azadbakht y Azadbakht 2008).

Anualmente, de 75,000 a 100,000 personas muere de amibiasis (disentería) en todo el mundo. Debido a la motilidad de este organismo, causa serios cambios patológicos y algunas veces úlceras en colon, y si entra al torrente sanguíneo, puede aparecer como abscesos en el hígado o cerebro. Plantas medicinales como la ipecacuana, mango y el árbol de papaya son algunos de las plantas antiamibianas (Azadbakht y Azadbakht 2008).

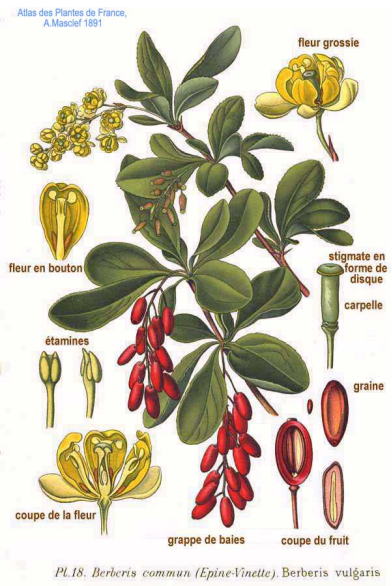
Trichomoniasis es una infección protozoaria urogenital en hombres y mujeres transmitida por relaciones sexuales. Plantas medicinales como el arrayán y la lavanda, están dentro de las plantas cuyos extractos y esencias son eficaces contra *T. vaginalis* (Azadbakht y Azadbakht 2008).

Los extractos de materiales vegetales a trabajar en este proyecto y que se consideran buenos prospectos para obtener una actividad antiprotozoaria significativa son, raíz de *B. vulgaris* y rizoma de *C. longa*.

2.2.1. *Berberis vulgaris*

Berberis vulgaris pertenece a la familia Berberidaceae (Tabla 1) y es un abrueto pequeño el cual crece en Europa, Africa y Asia, especialmente al borde de bosques y en lugares con mucha luz. *B vulgaris* es cultivada por sus importantes propiedades biológicas. Sus hojas tienen forma ovoide y están agrupadas en rosetas, tiene tallos espinosos, flores amarillas y su fruta de forma elipsoidal de color rojo tiene sabor agrio y astringente (Ciulei et al., 1993).

Tabla 1. Taxonomía de *B. vulgaris*.

Reino:	Plantae	
Subreino:	Tracheobionta	
División:	Magnoliophyta	
Clase:	Equisetopsida	
Subclase:	Magnoliidae	
Orden:	Ranunculales	
Familia:	Berberidaceae	
Subfamilia:	Berberoideae	
Tribu:	Berberideae	
Género:	<i>Berberis</i>	
Especie:	<i>vulgaris</i> L.	

Berberis vulgaris Linnaeus » Fuente: Database of Vascular Plants of Canada (VASCAN)

Los principales compuestos bioactivos de *B. vulgaris* son alcaloides (berberina, berbamina, jatrorrhicina, columbamina, berberubina, oxiacantina, palmarina) (Figura 5), vitamina C, resina y taninos, pero también flavonoides como quercetina y kaempferol (Ciulei et al., 1993; Suau et al. 1998). Las partes de la planta mas utilizadas para fitoterapia son la corteza (tallo y raíz), sin embargo, hojas y fruto también son utilizados. Los usos farmacológicos mas importantes de *B. vulgaris* son en enfermedades del riñon, bilis e hígado (hepatoprotector), también en problemas en boca y oftalmológicos. *B. vulgaris* tiene propiedades tónicas, antimicrobianas, antimiméticas, antipiréticas, antipruriginosas y colagogas y también ha sido usada en algunos casos de piedras en el riñon, disentería, leishmaniasis y malaria (Aghbashlo et al., 2008).

La mayoría de sus propiedades son debido a la presencia de algunos alcaloides, tal como lo es la berberina y palmatina, los cuales tienen capacidad inhibitoria de la enzima MAO, jatrorrhizina tiene las mismas propiedades farmacológicas que berberina, pero presenta menor toxicidad; oxicantina actúa como vasodilatador e hipotensor, así como también la berbamina, la cual también presenta propiedades antiinflamatoria y

antioxidante (Fatehi, 2005). La mayor parte de la actividad de *B. vulgaris* se debe sobre todo a la acción antioxidante generada por la presencia de algunos compuestos flavonoides, alcaloides y otros compuestos con grupos hidroxilo fenólicos.

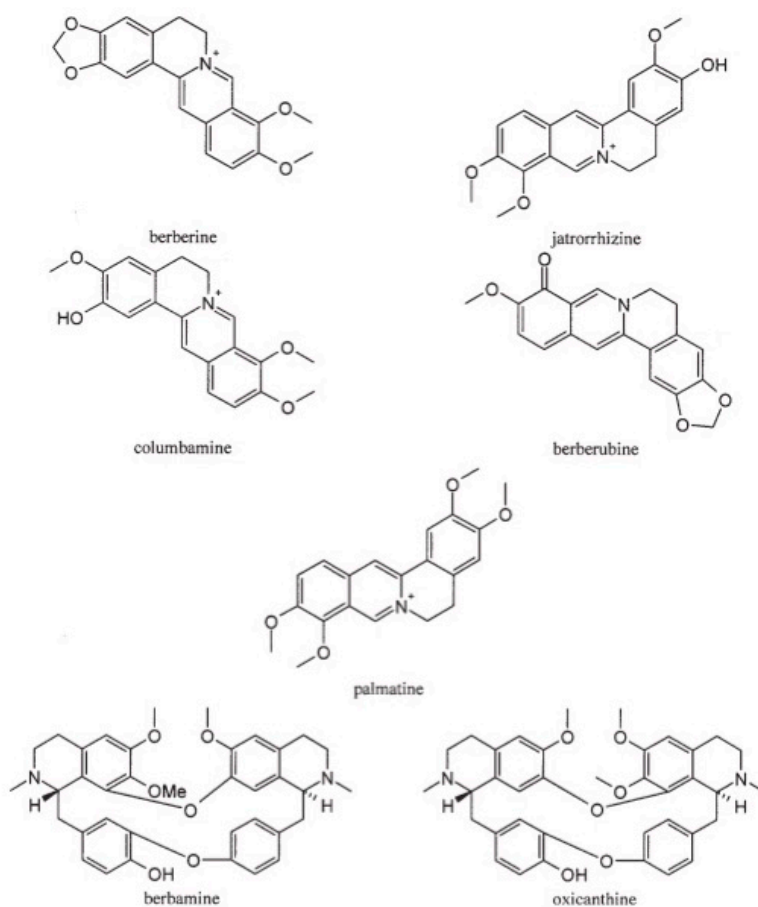


Figura 5. Estructuras de los principales alcaloides que contiene la planta *B. vulgaris*.

Berberina es uno de los componentes principales de *B. vulgaris* con propiedades antibacteriales y antifúngicas. Estudios han demostrado que este alcaloide tiene efectos inhibitorios en el crecimiento de *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis* y *Staphylococcus aureus* (Freile, 2003). Han y Lee (2005) en un estudio, demostraron que la combinación de anfotericina B y berberina, puede reducir hasta el 75% de la dosis requerida de anfotericina B en el tratamiento de candidiasis. Soffarr et al. (2001), encontraron que berberina tiene efectos inhibitorios en el crecimiento de *T. vaginalis* similar al metronidazol.

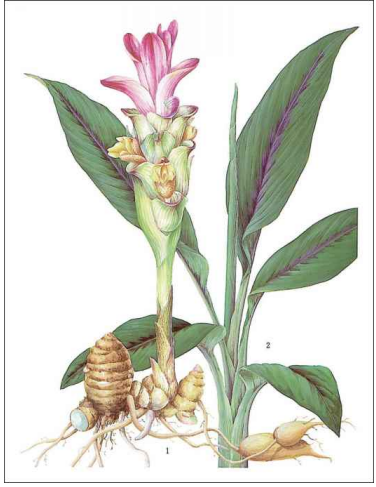
Los resultados de un estudio realizado por Masoudi (2016), demostraron que un gel vaginal con extractos de *Myrtus communis* o *B. vulgaris* en base de metronidazol fueron mas efectivos que metronidazol solo en vaginosis bacteriana sin ningún efecto secundario serio, ni recaídas.

Wright et al. (2000) realizaron un estudio en el cual evaluaron la actividad de 21 alcaloides contra *Plasmodium falciparum* (cepa multiresistente K1) y *E. histolytica*, así como también, evaluaron su actividad citotóxica *in vitro*. El grupo de los alcaloides protoberberina, obtuvieron la actividad antiplasmódica mas alta (dihidrodiscretina (IC₅₀) 0.64 μ M y berberina (IC₅₀) 0.968 μ M). Ninguno de los compuestos presentó una significativa actividad contra *E. histolytica*. Ha sido reportado que berberina inhibe el crecimiento de *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis in vitro* pero se necesitan concentraciones altas (1 mg/mL) y ésto es consistente con el bajo efecto observado en el estudio con (IC₅₀) 111 μ M. Berberina como sulfato en dosis de 2 mg/kg por inyección intramuscular o 3 mg/kg de forma oral ha sido reportada efectiva para prevenir el desarrollo de amibiasis hepática en cuyos con *E. histolytica*, sugiriendo que su actividad *in vivo* es mayor a la observada *in vitro*.

2.2.2. *Curcuma longa*

La cúrcuma (*C. longa*) pertenece a la familia Zingiberaceae (Tabla 2) y se encuentra distribuida por todas la regiones tropicales y subtropicales del mundo. Cúrcuma es una planta perenne con raíces tuberosas con pulpa de color anaranjado brillante y con una cascara dura color café. La India es el principal productor de cúrcuma en el mundo, contribuyendo con alrededor de el 90% del total de la producción mundial. *C. longa* ha sido utilizada en la medicina ayurvédica en la India por miles de años (Sharma et al., 2005). También se utiliza como colorante en alimentos (Buescher y Yang, 2000) y ha sido investigada por sus efectos biológicos en numerosos estudios en los últimos años (~6,200 citas en PubMed hasta diciembre del 2013) (Wachter, 2014).

Tabla 2. Taxonomía de *C. longa*.

Reino:	Plantae	
Subreino:	Viridiplantae	
División:	Tracheophyta	
Clase:	Magnoliopsida	
Superorden:	Liliana	
Orden:	Zingiberales	
Familia:	Zingiberaceae	
Género:	<i>Curcuma</i>	
Especie:	<i>longa</i> L.	

Curcuma longa Linnaeus » Fuente: Zingiberaceae of North America Update, database (version 2010).

Los curcuminoides son derivados fenólicos los cuales son los principales constituyentes fitoquímicos de *C. longa*. Curcumina o diferuloilmetano que tiene como fórmula 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona (Figura 6) (Moghadamtousi et al., 2014).

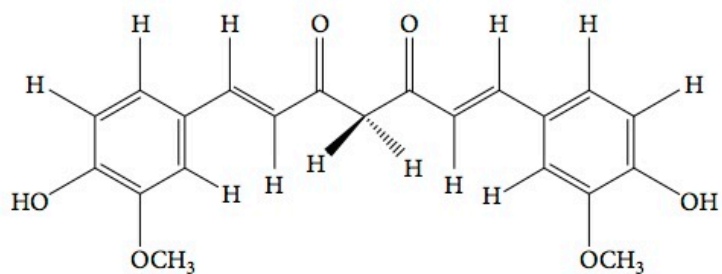


Figura 6. Estructura química de curcumina.

Hay una gran cantidad de documentación sobre los potentes efectos farmacológicos de curcumina que han sido descubiertos, entre ellos son, efectos inhibitorios en *Giardia lamblia* (Pérez-Arriaga et al., 2006), esporozoito de *Eimeria tenella* (Khalafalla et al., 2011), *Plasmodium* spp. (Mimche et al., 2011), *Cryptosporidium parvum* (Shahiduzzaman et al., 2009), *Leishmania amazonensis* and *L. mexicana*, *Trypanosoma*

brucei (Changtam et al., 2010), *Schistosoma mansoni* (Allam, 2009) y hasta VIH (Barthelemy et al., 1998). También se han descrito efectos inmunomodulatorios (Yadav et al., 2005), antiinflamatorios (Chainani-Wu, 2003), antioxidantes (Wei et al., 2006) y hasta efectos anticarcinogénicos (Devasena et al., 2003). Además, se ha mostrado un efecto protector de curcumina en células β del páncreas (Srivivasan et al., 2003). En contra de *T. vaginalis*, se mostró una alta efectividad con curcumina *in vitro* y la eficacia de curcumina no es afectada por resistencia al metronidazol (Wachter, 2014).

Los curcuminoides también han presentado efectos antileishmania. La concentración de 2 mg/mL de extracto de cúrcuma aceleró la muerte de promastigotos *in vitro*, comparado con el 0.2 mg/mL de concentración que mató a las células en 88 horas de exposición (Hosseini, 2012).

Todas las concentraciones de curcumina que se utilizaron en un estudio realizado por Pérez-Arriaga et al. (2006) inhibieron el crecimiento y la adherencia del trofozoito de *G. lamblia* en mas del 50% de la dosis en un tiempo esperado. Se describió la inducción de alteraciones morfológicas como protuberancias formadas dentro de la membrana citoplasmática, deformación causada por inflamación y aglutinación de las células. La curcumina induce un comportamiento parecido a la apoptosis y tinción del núcleo en una dosis y tiempo esperados. Se concluyó que la curcumina exhibió un efecto citotóxico en *G. lamblia*.

Se estudió la obtención de un extracto de cúrcuma por extracción sólido-líquido con agitación y a temperatura de ebullición, con dos pases de 30 min cada uno. El proceso fue optimizado mediante un diseño de superficie de respuesta con dos factores (temperatura de extracción y concentración alcohólica) y dos variables de respuesta (contenidos de curcumina y sólidos totales). Se obtuvo un óptimo rendimiento con alcohol etílico a 75.7% en ebullición con rendimiento expresado en porcentaje de sólidos solubles de 91.7%, con un contenido de curcumina de 0.52; 4.6% de sólidos y con buena calidad sensorial (Borges et al. 2011).

Wachter et al. 2014 determinaron la eficacia de curcumina contra *T. vaginalis*. Las concentraciones efectivas (EC) fueron evaluadas usando tres tipos de cepas, cada una con una susceptibilidad diferente al metronidazol. En todas las cepas probadas, se alcanzó el 100% de eradicación de las células de *T. vaginalis* en 24 h con una concentración de curcumina de 400 µg/ml, la cual fue muy bien tolerada por la mucosa humana. Las EC₅₀ para la cepa ATCC30001 fue de 84.2 ppm, cepa ATCC30236 de 73 ppm y cepa ATCC50138 de 105.5 ppm. Es así que la curcumina es un compuesto prometedor para el tratamiento de tricomoniasis.

El extracto de *C. longa* parece ser un candidato prometedor para el tratamiento contra protozoarios. El problema que tiene su metabolito secundario, la curcumina, es su baja biodisponibilidad. Estudios en animales han mostrado que la curcumina se metaboliza rápidamente, se conjuga en el hígado y se excreta por las heces, teniendo por tanto una limitación en su biodisponibilidad (Dulbecco y Savarino, 2013; Gryniewicz y Slifirski, 2012). Por ello, es necesario conjugar la curcumina con otros compuestos como pueden ser los fosfolípidos o la piperina, lo cual mejoran su absorción y, por tanto, su biodisponibilidad y actividad (Witkin y Li, 2013).

Otra de las formas para mejorar la biodisponibilidad y actividad de este tipo de compuestos es mediante el diseño de diferentes sistemas de administración, entre los cuales se encuentran los sistemas nanoparticulados que son de los que se hablarán a lo largo de este trabajo.

2.3. Sistemas nanométricos acarreadores de fármacos

En los últimos 35 años, los avances de la nanotecnología han abierto diferentes nuevas perspectivas en las ciencias médicas, especialmente en el campo de la administración de fármacos.

Para hacer frente a éste reto de la medicina, la tecnología farmacéutica ha desarrollado los sistemas nanométricos que contienen el principio activo (moléculas o fragmentos de moléculas) incluido en un vehículo que lo transporta. Como sistemas nanométricos que

son permiten que el fármaco o compuesto activo que llevan asociado pueda atravesar las diferentes barreras biológicas del organismo lo cual no se podría realizar con los convencionales sistemas de liberación ya que en éstos son fundamentalmente las propiedades fisicoquímicas las que condicionan su absorción y biodistribución (Figura 7) (Vila-Jato, 2006).

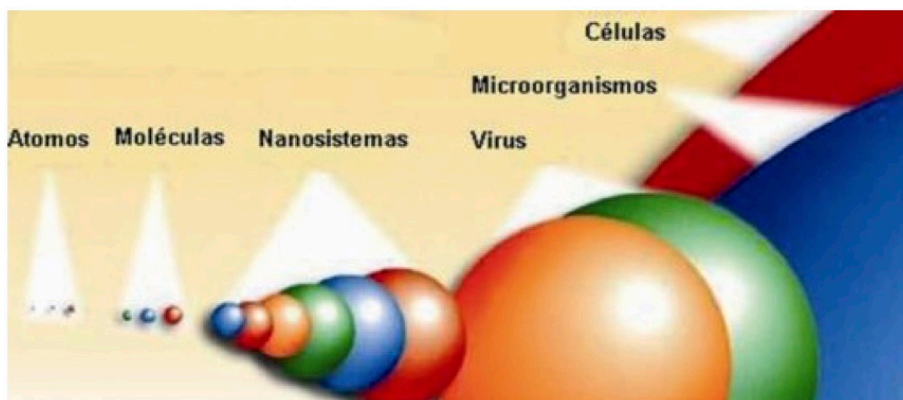


Figura 7. Los sistemas nanoscópicos son mayores que las moléculas típicas y algunos más pequeños que los virus. En su tamaño son similares a muchas proteínas lo que constituye una de las razones por las que pueden interaccionar en el interior de las células (Vila-Jato, 2006).

La nanotecnología terapéutica es una disciplina relativamente reciente en el campo de las ciencias farmacéuticas, que ha revolucionado la medicina moderna. Esta disciplina implica el empleo de nanopartículas como sistemas de vectorización, protección y liberación controlada de moléculas de interés terapéutico, cuyo tamaño fluctúa en el orden de los nanómetros. Estos vectores permiten mejorar la biodistribución de moléculas frágiles o complejas y favorecer su interacción con tejidos específicos, protegiendo a su vez el tejido sano. Para cumplir estas funciones, deben ser elaboradas con materiales biocompatibles y biodegradables que aseguren inocuidad y que a su vez otorguen las propiedades deseadas dependiendo del objetivo terapéutico. Dentro de estos materiales destacan los polímeros, debido a su naturaleza fisicoquímica y propiedades de funcionalización con ligandos específicos para ser reconocidos por receptores sobreexpresados en la superficie de determinadas células. Las aplicaciones médicas de las nanopartículas poliméricas (NPP) son diversas, pudiendo ser útiles como eficientes medios de diagnóstico y/o herramientas terapéuticas contra patologías severas como las enfermedades neurodegenerativas, infecciones y cáncer (Gómez-Gaete, 2014).

Las NPP son partículas coloidales sólidas de tamaño inferior a 1000 nm (1 μm) (Brigger et al. 2002), generalmente entre 10 y 500 nm, constituidas por polímeros naturales o sintéticos. Dependiendo del proceso seguido en su elaboración se pueden obtener dos tipos de estructuras: nanoesferas o nanocápsulas. Las primeras tienen una estructura tipo matriz polimérica, en la que se encuentra disperso el principio activo, mientras que las segundas poseen un núcleo de carácter oleoso, que contiene el fármaco, rodeado de una cubierta polimérica. Debido a la elevada superficie específica de éstos sistemas el principio activo también puede ser adsorbido en la superficie del sistema nanoparticular (Vila-Jato, 2006). La estructura general y la localización del principio activo en las nanopartículas se presenta en la siguiente figura:

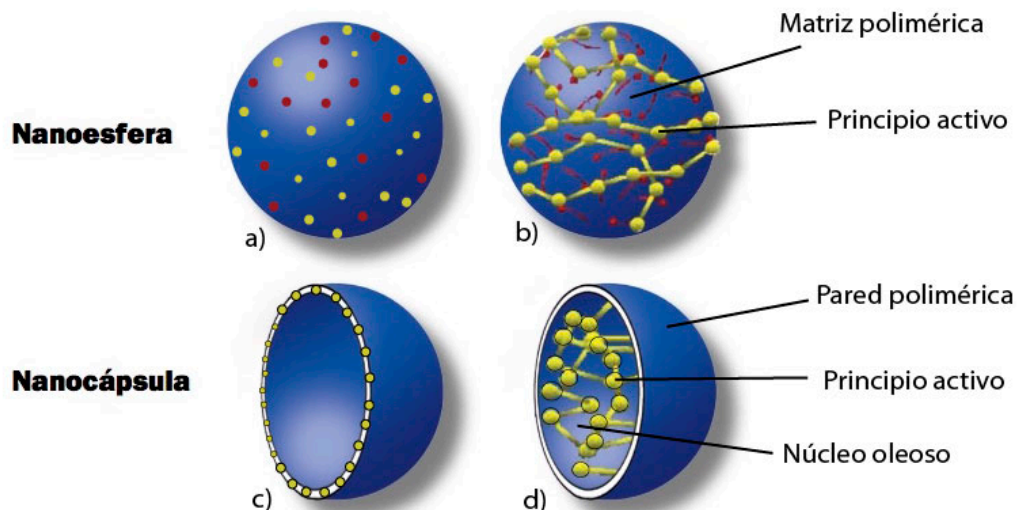


Figura 8. Representación esquemática de nanoesferas y nanocápsulas: a) principio activo retenido en la matriz polimérica de las nanoesferas; b) principio activo adsorbido o disperso molecularmente en la matriz polimérica de las nanoesferas c) principio activo adsorbido en la pared polimérica de las nanocápsulas d) principio activo disuelto en el núcleo oleoso de la nanocápsulas, (Puisieux et al. 1994).

Dentro de los objetivos que se pueden alcanzar empleando nanopartículas cargadas con moléculas terapéuticas destacan (De Jong y Borm, 2008):

- Mejorar la estabilidad física y química de los principios activos encapsulados.
- Aumentar la absorción de moléculas activas, lo que se traduce en una mejor biodisponibilidad.

- Actuar como sistemas de liberación controlada, reduciendo fluctuaciones de concentración de principios activos en sangre.
- Alcanzar tejidos/barreras específicas y penetrar células inalcanzables por principios activos convencionales gracias a su pequeño diámetro.
- Disminuir los efectos adversos y toxicidad asociada a la administración de fármaco libre.
- Otorgar protección de la molécula atrapada, por ejemplo, contra la degradación enzimática, química o inmunológica.

La bioaceptación del polímero, propiedades fisicoquímicas del principio activo y el objetivo terapéutico influenciarán la decisión final para escoger el polímero apropiado, tamaño de partícula y el método de fabricación de las nanopartículas. Las diferentes alternativas de sistemas coloidales acarreadores de principios activos son los liposomas, niosomas y microemulsiones, los cuales son similares a las NPP en cuanto a su forma, tamaño y modo de administración, sin embargo, las NPP ofrecen ventajas adicionales en comparación a los diferentes tipos de acarreadores coloidales, tales como, mayor estabilidad cuando se encuentran en fluidos biológicos, mayor capacidad de carga del principio activo y su protección en contra de la degradación, lo que conlleva a un aumento de la concentración intracelular. Además de una mayor estabilidad, este tipo de nanopartículas, por su naturaleza, presentan una capacidad única para liberar el activo de una manera controlada (Roney et al. 2005).

2.3.1. Preparación de nanopartículas poliméricas

La técnica de preparación de nanopartículas en este trabajo fue la técnica modificada de nanoprecipitación, la cual se basa en la difusión de dos fases esenciales; una fase orgánica, la cual contiene disolvente orgánico miscible en agua y es en donde se disuelve el polímero y el principio activo, ambos hidrofóbicos, y una fase acuosa (Fessi et al. 1988). La fase orgánica se añade lentamente con un inyector en el seno de la fase acuosa y se obtiene una suspensión coloidal que contiene las nanopartículas no purificadas por la presencia del disolvente. Este método simple se presenta en la siguiente figura:

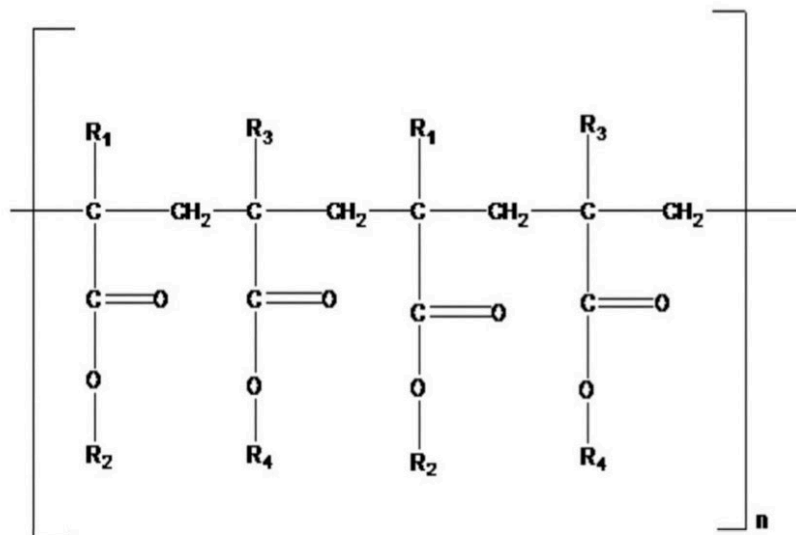


Figura 9. Técnica de nanoprecipitación.

La selección del polímero debe basarse dependiendo las características que se desean en el sistema nanoparticulado, la biocompatibilidad y compatibilidad con el activo. Los polímeros mas comunes incluyen policaprolactona (PLC), ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), Eudragit® y polialquilcianoacrilato (PACA), entre otros. De acuerdo con Khoee y Yaghoobian (2009), los polímeros sintéticos muestran mayor reproducibilidad y mayor pureza comparado con los polímeros naturales y pueden ser modificados de acuerdo con los requisitos.

En este trabajo, las formulaciones de nanopartículas se hicieron con el polímero Eudragit® EPO, el cual es un copolímero catiónico basado en dimetilaminoetil metacrilato, butilmetacrilato y metil metacrilato. Químicamente se conoce como poli (butil metacrilato-co-(2-dimetilaminoetil) metacrilato-co-metil metacrilato, es soluble en pH gástrico de hasta 5. Posee un peso molecular de aproximadamente 47,000 g/mol, valor álcali de 180 mg KOH/g de polímero (Patra et al. 2017).

En el año 1954, los primeros polímeros Eudragit® salieron al mercado (Figura 10). Estos polímeros fueron desarrollados por el Dr. Rohm, son polímeros sintéticos de ácido acrílico y sus derivados. Polymetacrilatos son polímeros sintéticos catiónicos y aniónicos de metacrilatos de dimetilaminoetilo, ácido metacrílico y esteres del ácido metacrílico en diferentes proporciones. Una gran cantidad de éstos, están disponibles comercialmente y se encuentran en polvo, dispersiones acuosas o, soluciones orgánicas (Rowe et al. 2009).



For Eudragit E:

$R_1, R_3 = \text{CH}_3, R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2, R_4 = \text{CH}_3, \text{C}_4\text{H}_9$

For Eudragit L and Eudragit S:

$R_1, R_3 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}, R_4 = \text{CH}_3$

For Eudragit FS:

$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{H}, \text{CH}_3, R_3 = \text{CH}_3, R_4 = \text{CH}_3$

For Eudragit RL and Eudragit RS:

$R_1 = \text{H}, \text{CH}_3, R_2 = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, R_3 = \text{CH}_3, R_4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$

For Eudragit NE 30 D and Eudragit NE 40 D:

$R_1, R_3 = \text{H}, \text{CH}_3, R_2, R_4 = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$

For Acryl-EZE and Acryl-EZE MP; Eudragit L 30 D-55 and Eudragit L 100-55,

Eastacryl 30 D, Kollicoat MAE 30 D, and Kollicoat MAE 30 DP:

$R_1, R_3 = \text{H}, \text{CH}_3, R_2 = \text{H}, R_4 = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$

Figura 10. Estructuras químicas de Eudragit®.

Los polímeros Eudragit® no se consideran materiales tóxicos ni irritantes. El consumo diario en humanos que se considera seguro son 2 mg/kg. Está incluido en la guía de ingredientes inactivos de la FDA, como ingredientes para medicinas medicina no parentales autorizadas en el Reino Unido y en la lista canadiense de ingredientes no medicinales aceptados.

2.3.2. Extractos incorporados en nanopartículas poliméricas

Existen diferentes estudios dónde incorporan extractos de plantas o activos pertenecientes a fuentes naturales a sistemas nanoparticulados, entre ellos, un estudio realizado por Mehra et al. en 2016 donde logran encapsular berberina, alcaloide isoquinólico el cual se extrae de la corteza y raíz de la planta de *B. vulgaris*. Berberina ha sido usada en la medicina ayurvédica ya que posee propiedades antimicrobianas, antidiabéticas, anticancerígenas, etc. Sin embargo, la baja solubilidad de la berberina conduce a una baja estabilidad y biodisponibilidad en formulaciones médicas y así decrece su eficacia. Por lo tanto, las formulaciones con nanopartículas de berberina pueden ayudar a eliminar los factores limitantes para la utilización en la industria farmacéutica. El polímero utilizado para encapsular berberina fue el alginato de sodio mediante el método de emulsión por evaporación del solvente usando polisorbato 80 como tensoactivo. La formulación optimizada fue 1% v/v de polisorbato 80 y 0.01% w/v de alginato de sodio. El tamaño de partícula obtenido fue de 71.18 nm. Las NPP biodegradables con berberina obtenidas, mostraron una mejor actividad antibacteriana comparada con una solución acuosa de berberina.

En el caso de los alcaloides de *B. vulgaris*, se han usado ciclodextrinas para obtener sensores ópticos. Así, berberina fue encapsulada en β -ciclodextrina butilada la cual fue inmovilizada en PVC (Yang et al., 2004; Yu et al., 2005; Yang et al., 2005), y también en dímero de β -ciclodextrina (Liu et al., 2007). En años mas recientes, complejos del extracto de *B. vulgaris* con ciclodextrinas están siendo estudiados con el fin de obtener formulaciones las cuales puedan ser utilizadas en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Cyr, 2009). En el 2010, Hadaruga y colaboradores obtuvieron la caracterización de diferentes complejos de extracto de *B. vulgaris* con β -ciclodextrina con la intención de que sean utilizados para formulaciones hepatoprotectoras con mayor biodisponibilidad.

Gran cantidad de estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la curcumina tiene actividades antibacterianas, antiinflamatorias, antitóxicas, antilipídicas, antioxidantes y anticancerígenas, sin embargo, tiene muy baja biodisponibilidad (baja solubilidad, pobre

absorción, alto rango de metabolismo en las células intestinales, rápida eliminación) (Anand et al., 2007). Una de las razones por la cual la curcumina presenta baja biodisponibilidad, es que es insoluble en agua a pH ácido o neutro y esto ocasiona que se dificulte la absorción (Maiti et al., 2007). Este obstáculo puede ser resuelto al desarrollar una formulación con nanopartículas para mejorar el perfil de administración del compuesto activo, especialmente por los que son químicamente menos biodisponibles. Por lo tanto, la aplicación de curcumina necesita de polímeros que sean capaces de transportar y entregar este compuesto activo para ser absorbido adecuadamente, como lo es el quitosán, que fue usado por Sundari et al. en 2013, al hacer una nanoencapsulación.

En un estudio, ratas control infectadas sin tratamiento fueron inoculadas con trofozoitos de *G. lamblia* en una dosis de 2×10 trofozoitos/rata. El grupo experimental fue infectado y después tratado individualmente o en conjunto con curcumina, curcumina en nanopartículas, quitosán, quitosán en nanopartículas y nanopartículas de plata. El número de trofozoitos en las heces y en secciones del intestino fueron detectados, la toxicidad de las nanopartículas fue evaluada comparando parámetros hematológicos e histopatológicos entre el grupo control y el grupo infectado en tratamiento, la cantidad de plata fue medida en hígado, riñones, intestino delgado, pulmón y cerebro de las ratas en tratamiento con nanopartículas de plata. En las ratas infectadas, el número de parásitos en heces y en secciones del intestino delgado disminuyeron con tratamiento comparado con ratas infectadas sin tratamiento. La terapia con nanopartículas individualmente que tuvo mayor efecto fue la de nanopartículas de plata. La terapia en conjunto fue la que dio mejores resultados que la individual, siendo la combinación de nanopartículas de plata y nanopartículas con curcumina la que obtuvo mejores resultados, pero sin tener la erradicación total. Ninguno de los tratamientos presentó toxicidad. La plata acumulada de los diferentes órganos se encontró dentro de los límites de seguridad (Said et al., 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades parasitarias causadas por *E. histolytica* y *T. vaginalis* representan un problema de interés global. El principio activo comúnmente utilizado para combatir tanto amibiasis como tricomoniasis es el metronidazol, el cual es eficaz y de baja toxicidad en dosis bajas. Sin embargo, se ha reportado que éstas enfermedades son ahora más frecuentes y crónicas ya que han surgido cepas resistentes a este fármaco y, por consecuencia, se ha tenido que aumentar la dosis y/o el tiempo del tratamiento. Esto ocasiona que el activo presente efectos secundarios no deseados ya que desarrolla diferentes efectos secundarios, entre ellos una alta hepatotoxicidad. Es por ello, la importancia de encontrar nuevas fuentes de compuestos activos antiparasitarios o de nuevas formas de presentar estos activos en sistemas de liberación que mejoren su eficiencia. En el presente estudio convergen las dos estrategias, por un lado de la gran variedad de productos naturales que han sido utilizados en la medicina tradicional de diferentes culturas para tratar parasitosis; se han considerado los extractos de rizoma de *C. longa* y raíz de *B. vulgaris* para validar su empleo contra protozoos y por el otro lado, se evaluó el mejoramiento de su actividad antiparasitaria mediante su incorporación en nanopartículas poliméricas como un nuevo sistema de liberación.

4. HIPÓTESIS

La incorporación en nanopartículas poliméricas del extracto etanólico del rizoma de *C. longa* y el extracto metanólico de la raíz de *B. vulgaris* mejora su actividad antiparasitaria.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la actividad antiprotozoaria *in vitro* del extracto etanólico del rizoma de *C. longa* y extracto metanólico de la raíz de *B. vulgaris* incorporados de forma individual en nanopartículas poliméricas contra *T. vaginalis* y *E. histolytica*.

5.2. Objetivos particulares

1. Obtener el extracto etanólico del rizoma de *C. longa* y el extracto metanólico de la raíz de *B. vulgaris*.
2. Caracterizar de forma parcial los extractos obtenidos con pruebas fitoquímicas, cromatográficas y espectrofotométricas.
3. Desarrollar y caracterizar las diferentes formulaciones de sistemas nanoparticulados menor de 200 nm que incorporen los extractos de *C. longa* y *B. vulgaris* en nanopartículas poliméricas.
4. Determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de los extractos de *C. longa* y *B. vulgaris* libres y de las formulaciones de nanopartículas poliméricas contra *E. histolytica* y *T. vaginalis*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material vegetal

El material vegetal se adquirió en presentación en polvo del rizoma de *C. longa* y raíz de *B. vulgaris*, ambos con lugar de origen en India y fueron adquiridos en Starwest Botanicals (Sacramento, CA, EUA).

6.2. Cepas

6.2.1. *Entamoeba histolytica*

Cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*, cultivada en condiciones axénicas *in vitro* en el medio de cultivo TYI-S-33.

6.2.2. *Trichomonas vaginalis*

Cepa GT15 de *T. vaginalis*, cultivada en condiciones axénicas *in vitro* en el medio de cultivo TYI-S-33.

6.3. Preparación del medio basal TYI-S-33

La composición del medio TYI-S-33 (Keister, 1983) se encuentra en la Tabla 3. Se mezclan los componentes, se disuelven en 850 mL de agua desionizada. El pH es ajustado a 7.0 con NaOH 10 N y se afora a 1000 mL con agua desionizada. Se agregan 5 mL del medio en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca (borosilicato, Corning Co., Alemania). El medio fue esterilizado por autoclave por 15 min a 121°C, 15 lb de presión y posteriormente se almacenado a -20°C hasta su uso.

Tabla 3. Composición del medio TYI-S-33.

REACTIVO	g/L
Extracto de levadura	10
Peptona de caseína	20
Ácido ascórbico	1
Cisteína	1
Cloruro de sodio	3.3
Glucosa	10
K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	0.6
Citrato férrico amónico	0.028

6.4. Preparación del suero bovino

La sangre fue recolectada del rastro de la ciudad y se deja coagular. El suero fue separado por sedimentación a 3500 rpm por 15 min. Posteriormente, el suero fue prefiltrado con papel Whatman N° 1, seguido por filtración con una serie de filtros HAWP Millipore (Beford, MA, USA) de 5 a 0.22 µm. Finalmente, fue esterilizado utilizando sistemas de filtración al vacío de un litro con filtros de tamaño de poro de 0.22 µm. El suero estéril fue descomplementado por calentamiento a 56°C por 30 min, se deja enfriar a temperatura ambiente y se añaden 25 mL de una mezcla de vitaminas (JRH Biosciences, Lenexa, KS) por cada litro de suero. El suero fue distribuido en alícuotas de 100 mL, en botellas ámbar, estériles, de vidrio con tapón de rosca y se almacena a -20°C.

6.5. Cinéticas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo inoculando 20,000 trofozoítos de *E. histolytica* y 100,000 trofozoítos de *T. vaginalis* en 5 mL de medio basal TYI-S-33 adicionado con 10% de suero bovino, en tubos con tapón de rosca de 13 x 100 mm. Los tubos se incubaron a 36.5°C durante 120 h y cada 24 h se determinó el número de trofozoítos para posteriormente evaluar sus parámetros de crecimiento en el medio. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado. El tiempo de generación se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$G = \frac{t}{3.3} \log \frac{b}{B}$$

G = tiempo de generación

t = intervalo de tiempo de la fase exponencial

B = número de organismos al comienzo del intervalo de tiempo

b = número de organismos al final del intervalo de tiempo

Para determinar el tiempo de duplicación se utilizó la siguiente ecuación:

$$Td = 0.693 G$$

6.6. Mantenimiento de las cepas

Cada cepa se mantuvo en medio de cultivo en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca con 5.5 mL de medio TYI-S-33, inoculando 20,000 trofozoítos/mL de *E. histolytica* y 100,000 trofozoítos/mL de *T. vaginalis*. Cada cultivo se incubó a 36.5°C con un tiempo de 72 h para *E. histolytica* y 48 h para *T. vaginalis*.

Antes de cada resiembra, cada cultivo se observó en un microscopio invertido para comprobar el buen estado de las cepas. Los tubos con el cultivo se colocaron en un recipiente con agua y hielo durante 20 min con el fin de despegar las células adheridas al vidrio, y posteriormente se volteó el tubo una y otra vez para homogenizar el contenido. El número de amibas se determinó tomando una alícuota del cultivo para el conteo de las células con hemocitómetro. Para poder realizar el conteo de *T. vaginalis* en el hemocitómetro se requirió fijar las células con una dilución de formalina (100 µL cultivo en 900 µL de formalina).

Cada cepa fue inoculada en su respectivo medio de cultivo, bajo el tiempo calculado de acuerdo a su cinética de crecimiento.

6.7. Extracción del material vegetal

Los extractos se obtuvieron por el método de maceración con metanol absoluto para *B. vulgaris* y con etanol absoluto para *C. longa*.

6.7.1. *Berberis vulgaris*

Se realizó una extracción en frío, tomando 30 g de la raíz en polvo de *B. vulgaris*, los cuales se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se le adicionaron 300 mL de metanol absoluto. El matraz se selló herméticamente para evitar evaporación del solvente durante la extracción y se mantuvo a una temperatura de -20°C por 24 h sin agitación.

6.7.2. *Curcuma longa*

Se tomaron 20 g del material vegetal en polvo y se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL para posteriormente, adicionar 200 mL de etanol absoluto. La mezcla se mantuvo en constante agitación a 60°C por 30 min.

Después del tiempo requerido para la extracción, se separó el solvente del resto del material vegetal por filtración con papel Whatman N° 1, posteriormente, se concentraron los extractos en un rotavapor a una temperatura de 30°C eliminando la mayor parte del solvente para después llevar a sequedad total en un horno de secado a 40°C. Los extractos se almacenaron en botes de vidrio ámbar a 4°C hasta su uso.

6.8. Rendimiento de los extractos

El rendimiento de los extractos se obtuvo usando la siguiente fórmula:

$$(\%) \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso obtenido}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Peso obtenido: peso obtenido en la extracción

Peso inicial: peso del material vegetal a extraer

6.9. Identificación parcial de grupos funcionales

Aún que los compuestos presentes en *C. longa* y *B. vulgaris* son bien conocidos, para poder confirmar su presencia en los extractos, se realizaron pruebas coloridas para identificar grupos funcionales de cada familia.

6.9.1. Prueba de Liebermann-Burchard

Para triterpenos y compuestos esteroidales. En una placa de porcelana se añadió 1 gota del extracto, 1 gota de cloroformo y 3 gotas del reactivo de Liebermann-Burchard (20 µl de ácido sulfúrico más 1 ml de ácido acético anhidro y 1 ml de cloroformo), un viraje de color hacia azul, verde, rojo o anaranjado es una prueba positiva para estos compuestos.

6.9.2. Prueba de Dragendorff

Para alcaloides. Se prepararon dos soluciones, la solución A con 0.85 g de nitrato de bismuto, se mezclaron con 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua y solución B con 8 g de yoduro de potasio disuelto en 20 ml de agua. El reactivo se preparó mezclando 5 ml de A, 4 ml de B y 100 ml de agua. Se disolvieron de 1-2 mg de la muestra en etanol y se colocaron unas gotas en una placa de porcelana y se añadieron unas gotas del reactivo. La prueba es positiva si se presentan coloraciones roja o naranja, persistentes por 24 h.

6.9.3. Prueba de Baljet

Para sesquiterpenlactonas. Se utilizaron 2 soluciones mezcladas en volúmenes iguales antes de usarse, reactivo 1: solución A: se disolvió 1.0 g de ácido pícrico en 100 ml de etanol; y la solución B: 10.0 g de hidróxido de sodio en 100 ml de agua bidestilada. A 3 gotas del extracto, se agregaron 4 gotas del reactivo 1, la coloración naranja a roja oscura representa una prueba positiva.

6.9.4. Prueba de NaOH.

Para determinar lactonas. Se disolvieron 1-2 mg de muestra en solución alcohólica de NaOH al 10%. La presencia del color naranja que desaparece al agregar HCl indica la presencia de un anillo lactónico.

6.9.5. Prueba de cloruro férrico.

Para oxhidrilos fenólicos. En un tubo de ensayo se colocaron 20 gotas del extracto y 10 gotas del reactivo de cloruro férrico. Es una prueba positiva si se presenta la formación de color rojo, azul, violeta o verde.

6.9.6. Prueba de 2,4-dinitrofenilhidracina

Para grupo carbonilo. En un tubo de ensayo se disolvieron 50 mg de 2,4- dinitrofenilhidracina en 1 ml de metanol caliente. Se agregan 50 mg del compuesto carbonílico y se calentó a baño María por 10 a 15 min; se dejó en reposo y se enfrió en baño de hielo. La aparición de un precipitado naranja indica la presencia de un grupo carbonilo.

6.9.7. Prueba del KMnO_4

Para dobles enlaces. Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 ml de agua, acetona o

metanol, posteriormente se añadió gota a gota una solución de KMnO_4 al 2% en agua. La prueba es positiva si se observa formación de un precipitado café, resultado de la formación de bióxido de manganeso.

6.9.8. Prueba de Shinoda

Determinación de flavonoides. Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 ml de etanol agregando unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y una o dos limaduras de magnesio; si la solución se torna de color rojo intenso, la prueba es positiva, otro color como anaranjado, verde o azul pueden estar presentes, flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas.

6.9.9. Prueba de las Saponinas

En un tubo de ensayo se colocaron 1-2 mg de muestra disuelta en 1 ml de agua, se sacudió. Si se forma una espuma abundante, la prueba se considera positiva.

6.9.10. Prueba de la Antrona

Determinación de carbohidratos. En un tubo de ensayo se colocaron 1-2 mg de la muestra disuelta en agua, después se dejó resbalar por las paredes del tubo una solución reciente de Antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico concentrado. La prueba es positiva si en la interfase aparece un anillo azul-verdoso o violeta.

6.10. Concentración de activo presente en el extracto

El compuesto activo más importante y el cual fue cuantificado en el extracto de *C. longa* es la curcumina y en el extracto de *B. vulgaris* es la berberina. Para cuantificar el activo presente en su extracto correspondiente se realizaron tres pasos: un barrido de absorción en la región ultravioleta y visible, preparación de curvas de calibración y la determinación de la concentración del analito por la sustitución de la señal dada en la

ecuación de la curva. Los estándares de curcumina y cloruro de berberina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich/Merck.

6.10.1. Barrido de absorción

Consistió en realizar una lectura en el espectrofotómetro UV/Vis con una solución de concentración conocida de los estándares, una de curcumina y otra de cloruro de berberina. Los analitos se disolvieron en metanol, el cual, a su vez se empleó como blanco. La lectura del barrido proporcionó el pico característico, en donde la sustancia a cuantificar absorbe una determinada longitud de onda (λ). Así mismo, se realizó un barrido de absorción del extracto crudo de *B. vulgaris* y así ver en qué λ se encuentran la mayor parte de los compuestos presentes en el extracto. El barrido de absorción se realizó desde 200nm a 550nm.

6.10.2. Curva de calibración

En relación a la longitud de onda, de los picos característicos, obtenida por medio de los barridos realizados a las soluciones de curcumina y cloruro de berberina, se realizaron sus curvas de calibración por triplicado, para así poder conocer la concentración de activo presente en su extracto correspondiente. A partir de una solución madre o stock, se realizaron cinco diluciones seriadas de los activos. Las soluciones seriadas brindaron absorbancias directamente proporcionales a la cantidad de analito en la muestra. Se ajustó por medio de alícuotas de la solución madre a las disoluciones secundarias para que éstas nos brindaran una lectura de alrededor a 1 de absorbancia. Al realizar la regresión lineal de los datos obtenidos de las lecturas [x = concentración ($\mu\text{g/mL}$); y = absorbancia (A)] se obtuvo una $R^2 \geq 0.98$, lo cual indica un índice de confianza aceptable para ajustar las lecturas del extracto a la ecuación de la recta y determinar por medio de ésta la concentración de curcumina y cloruro de berberina presentes en el extracto crudo.

6.10.3. Cuantificación de los activos presentes en los extractos

Se diluyeron 4 mg del extracto crudo en 10 mL de metanol. El extracto de *C. longa* se leyó en el espectrofotómetro UV/Vis a 421 nm, lectura a la cual se encuentra la longitud de onda máxima (λ_{\max}) que también es el pico característico de la curcumina, y en el extracto de *B. vulgaris* se realizaron dos lecturas, una a 349 nm, lectura a la cual se encuentra la λ del pico característico de la berberina, y otra a 226 donde se encuentra la λ_{\max} , y además de cuantificar la berberina, se puede cuantificar una concentración de otros compuestos presentes en el extracto. A partir de la señal dada por las lecturas, se determinó la concentración de los activos en base a las curvas de calibración realizadas sustituyendo los valores en la ecuación de la curva y posteriormente, se obtuvo el porcentaje del activo presente en cada extracto.

6.11. Preparación de las diluciones de los extractos

Para determinar la concentración inhibitoria media (CI_{50}) se requirieron diferentes diluciones. Se pesó 1 mg de cada extracto y se disolvió en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% en un vial ámbar, se dejó reposar por mínimo 4 h para su esterilización y se almacenó a 4°C. Se tomaron 500 μ L de la solución anterior y se diluyeron con 500 μ L de agua esterilizada para tener una concentración de 500 ppm de la muestra, se tomaron 500 μ L de la solución anterior y se añadieron 500 μ L de agua esterilizada para obtener una concentración de 250 ppm y así sucesivamente, hasta haber obtenido las siguientes concentraciones de 125 ppm y 62.5 ppm. Los viales ámbar que contenían estas soluciones fueron almacenados a 4°C.

Para las diluciones de las suspensiones de nanopartículas, se pesaron 2.5 mg de extracto y después de realizar el proceso de nanoprecipitación, la suspensión restante se llevó a 10 mL con agua destilada para obtener una dilución de 250 ppm. Esta suspensión fue esterilizada por medio de filtros Millex-GV de 0.22 μ m. Posteriormente se tomaron 500 μ L de la dilución esterilizada de 250 ppm y se agregaron 500 μ L de agua esterilizada

para obtener la dilución de 125 ppm. Se repitió este proceso para obtener las diluciones de 62.5, 31.25 y 15.6 ppm.

6.12. Preparación de nanopartículas poliméricas con extracto

Las nanopartículas cargadas con extracto fueron preparadas mediante la técnica de nanoprecipitación. Primero se realizaron pruebas para obtener las condiciones experimentales deseadas manipulando cantidad de polímero, volumen de solvente orgánico y volumen de agua destilada, con el fin de obtener nanopartículas menores a 200 nm. La formulación de nanopartículas consistió en la adición de una fase orgánica en una fase acuosa; la fase orgánica se compone de 50 mg de polímero Eudragit® EPO y 2.5 mg del extracto disueltos en 5 mL de un solvente orgánico miscible en agua (acetona para *C. longa* y metanol para *B. vulgaris*), y la fase acuosa corresponde a 9 mL de agua destilada. La adición de una fase en otra se llevó a cabo por inyección lenta y posteriormente se eliminó el solvente a presión reducida en un rotavapor a 30°C para así, obtener una suspensión acuosa de nanopartículas. La suspensión obtenida se llevó a 10 mL con agua destilada para así obtener una concentración de extracto de 250 ppm. Las suspensiones se almacenaron a 4°C hasta su uso.

6.13. Caracterización de las formulaciones de nanopartículas

Se llevó a cabo la caracterización de las formulaciones de NPP cargadas con los extractos lo cual incluye, tamaño y morfología, índice de polidispersidad (PDI), se identificaron las fracciones de los extractos que fueron atrapadas por las nanopartículas y la eficiencia de atrapamiento de los activos.

6.13.1. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI)

El tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI) de la suspensión se determinaron por espectroscopía de correlación fotónica. Una alícuota de la suspensión fue mezclada con agua bidestilada en una celdilla la cual se introdujo en el equipo

Malvern Zetasizer Nano ZS una temperatura de 25°C para determinar su tamaño y PDI por dispersión dinámica de luz láser. Las mediciones se realizaron por triplicado.

6.13.2. Morfología de las nanopartículas

El tamaño de las nanopartículas fue confirmado mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) donde, además se determinó la nanoestructura que conforma y el grado de agregación.

De las formulaciones de nanopartículas se hicieron diluciones y se tomó una alícuota la cual se colocó en un porta muestras y posteriormente, éste fue colocado en un desecador por dos días. Ya seca la muestra se llevó al microscopio electrónico de barrido en la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica de la UANL. El equipo es de la marca HITACHI, modelo SU8020.

6.13.3. Identificación de fracciones atrapadas en las nanopartículas

De forma cualitativa, por cromatografía en capa fina se identificaron las fracciones del extracto atrapadas en las nanopartículas mediante la comparación de los R_f (Factor de retención) obtenidos a partir del extracto crudo y el estándar del activo principal para cada extracto.

Se utilizaron placas cromatográficas de sílica gel (SIGMA-ALDRICH), en donde se colocó cada muestra con un capilar modificado. Las placas fueron cortadas a una medida de 9.5 cm de alto por 2.5 de ancho y la muestra fue aplicada a 1 cm de la parte inferior. La aplicación de la muestra se repitió 5 veces en el mismo punto, dejando secar entre aplicaciones, con el fin de aumentar la concentración de la muestra. Se colocan las placas con la muestra dentro de cubas cromatográficas las cuales contenían 3 mL de la mezcla de eluentes. Para separar las fracciones de *B. vulgaris* se usó cloroformo - metanol - ácido acético (7:2:1), además de 400 µL de agua, y para separar las fracciones del extracto de *C. longa*, se usó cloroformo - Ácido acético (9:1). Del mismo modo, se corrió el polímero

Eudragit® EPO con ambos eluentes para confirmar que éste no intervenga en la separación de las fracciones. Se observó la cromatoplaqueta bajo luz UV para posteriormente calcular el Rf (Factor de retención) midiendo la distancia del punto de aplicación de la muestra, a la mitad de la mancha detectada de la fracción y se dividió el valor obtenido sobre la distancia del punto de aplicación de la muestra, y la distancia recorrida por el disolvente, como se ve en la fórmula siguiente:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

6.13.4. Eficiencia de atrapamiento del activo en el sistema nanoparticulado.

Las formulaciones fueron caracterizadas por el contenido de los principales activos presentes en los extractos que fueron incorporados en el sistema nanoparticulado y se calculó el porcentaje de atrapamiento, tomando en cuenta como estándares la curcumina para el extracto de *C. longa* y cloruro de berberina para el extracto de *B. vulgaris*, los cuales fueron adquiridos en Sigma-Aldrich/Merck. La determinación de la cantidad de analitos atrapados se llevó a cabo en tres etapas:

6.13.4.1. Barrido de absorción

Consistió en realizar una lectura en el espectrofotómetro UV/Vis con una solución de concentración conocida de los analitos, una de curcumina y otra de cloruro de berberina. Los analitos se disolvieron en metanol, el cual, a su vez se empleó como blanco. La lectura del barrido proporcionó el pico característico, en donde la sustancia a cuantificar absorbe una determinada longitud de onda (λ).

6.13.4.2. Curva de calibración

En relación a la longitud de onda, de los picos característicos, obtenida por medio de los barridos realizados a las soluciones de curcumina y cloruro de berberina, se realizaron

sus curvas de calibración por triplicado, para así poder conocer la concentración de activo atrapado en el sistema nanoparticulado. A partir de una solución madre o stock, se realizaron cinco diluciones seriadas de los activos. Las soluciones seriadas brindaron absorbancias directamente proporcionales a la cantidad de analito en la muestra. Se ajustó por medio de alícuotas de la solución madre a las disoluciones secundarias para que estas dieran una lectura de alrededor a 1 de absorbancia. Al realizar la regresión lineal de los datos obtenidos de las lecturas [x = concentración ($\mu\text{g/mL}$); y = absorbancia (A)] se obtuvo una $R^2 \geq 0.98$, lo cual indicó un índice de confianza aceptable para ajustar las lecturas de la pastilla de nanopartículas a la ecuación de la curva y determinar por medio de ésta la concentración de curcumina y cloruro de berberina en la formulación de nanopartículas.

6.13.4.3. Cuantificación de los activos atrapados

Las suspensiones de nanopartículas se centrifugaron a 25,000 rpm por 3 h. Se decantó el sobrenadante, y las pastillas obtenidas durante el proceso de centrifugación se llevaron a congelación a -20°C por 24 h para posteriormente ser liofilizadas y almacenadas a 4°C hasta su uso. La pastilla se resuspendió en 10 mL de metanol para disolver el polímero y liberar los activos que fueron atrapados. La formulación de nanopartículas que contiene el extracto de *C. longa* se leyó en el espectrofotómetro UV/Vis a 421 nm, lectura a la cual se encuentra la longitud de onda máxima (λ_{max}) que también es el pico característico de la curcumina, y la formulación de nanopartículas que contiene el extracto de *B. vulgaris* se leyó a 349 nm, lectura a la cual se encuentra la λ del pico característico de la berberina. A partir de la señal dada por las lecturas, se determinará la concentración de los activos en base a las curvas de calibración realizadas sustituyendo los valores en la ecuación de la curva y posteriormente obtener porcentaje del activo atrapado.

6.14. Ensayo biológico

Se colocaron 50 μL de cada solución con los extractos en viales cilíndricos de 1 mL de capacidad (Bellco Glass Inc., USA). Cada vial se llenó con 950 μL de una suspensión de *E. histolytica* y *T. vaginalis* a una concentración de 2×10^4 y 1×10^5 trofozoítos/mL

respectivamente en medio TYI-S-33 más 10 % de suero bovino. Se realizó por triplicado para cada una de las diluciones (1000, 500, 250, 125, 62.5 ppm) y el blanco (medio TYI-S-33 con inóculo).

El mismo experimento se repitió con el lote completo de las formulaciones de nanopartículas para cada una de las diluciones (250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 ppm) por triplicado, así como también, el blanco (medio TYI-S-33) y el control (suspensión de nanopartículas con el polímero Eudragit® EPO sin extracto).

Todos los viales fueron incubados a una temperatura de 37°C por 72 h para *E. histolytica* y 24 h para *T. vaginalis*. Pasado el tiempo de incubación los viales fueron enfriados en un recipiente con agua y hielo por 20 min con el fin de despegar las células adheridas al vidrio, y posteriormente se determinó el número de trofozoítos por mL usando un hemocitómetro (Mata et al., 2008).

6.15. Análisis estadístico

Cada ensayo se realizó por triplicado en tres experimentos independientes calculando la media. El porcentaje de mortalidad fue comparado con respecto al blanco. La CI_{50} de cada extracto libre y de cada lote completo de la formulación de nanopartículas se obtuvo por análisis Probit (SPSS versión 17), donde también se calculó el límite de confianza del 95%. Se compararon los límites inferiores y límites superiores de la CI_{50} del extracto libre con los de la CI_{50} del lote completo de la formulación de nanopartículas, si éstos se traslapan, los tratamientos no presentan diferencia significativa, de lo contrario, los tratamientos presentan diferencia significativa.

7. RESULTADOS

7.1. Obtención de los extractos y rendimiento

Los extractos se obtuvieron mediante la técnica de maceración con etanol absoluto para *C. longa* con agitación a 60°C por 30 min y con metanol absoluto para *B. vulgaris* a -20°C por 24 h. Se calculó el porcentaje de rendimiento para cada extracto el cual se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de rendimiento en peso seco de los extractos de *C. longa* y *B. vulgaris*.

Extracto	Rendimiento
Etanólico de <i>C. longa</i>	8.86%
Metanólico de <i>B. vulgaris</i>	2.33%

7.2. Identificación parcial de grupos funcionales

Los compuestos presentes en *C. longa* y *B. vulgaris* son bien conocidos, para poder confirmar la presencia de los compuestos de interés en los extractos, se realizaron pruebas coloridas y de esta manera, se identificaron los grupos funcionales de cada familia. Los resultados de la identificación parcial se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Identificación química de grupos funcionales presentes en los extractos de *C. longa* y *B. vulgaris*.

Prueba	Extracto etanólico <i>C. longa</i>	Extracto metanólico <i>B. vulgaris</i>
Triterpenos y esteroides	+	-
Alcaloides	-	+
Sesquiterpenlactonas	+	+
Lactonas	-	+
Oxhidrilos fenólicos/Taninos	+	-
Grupo carbonilo	+	-
Insaturaciones	+	+
Flavonoides	-	+
Saponinas	-	-
Carbohidratos	+	+

Se representa con + el resultado positivo y con – el resultado negativo de acuerdo a cada prueba.

7.3. Concentración de activo presente en el extracto crudo

Para cuantificar la concentración de la curcumina y la berberina presentes en los extractos de *C. longa* y de *B. vulgaris* respectivamente, se realizaron tres pasos: un barrido de absorción, curvas de calibración y la sustitución de la señal dada por espectrofotometría UV/Vis en la ecuación de la curva.

7.3.1. Barrido de absorción

Primero se llevó a cabo un barrido de absorción con un espectrofotómetro UV/Vis para encontrar la longitud de onda máxima (λ_{\max}) y/o pico característico de los activos de curcumina y cloruro de berberina y posteriormente se realizaron los barridos de absorción de los extractos de *C. longa* y *B. vulgaris*, para obtener un perfil general de sus principales compuestos.

El extracto de *C. longa* en una disolución metanólica (20 ppm) presentó una longitud de onda de máxima absorción de 421 nm, tal como se muestra en la siguiente gráfica.

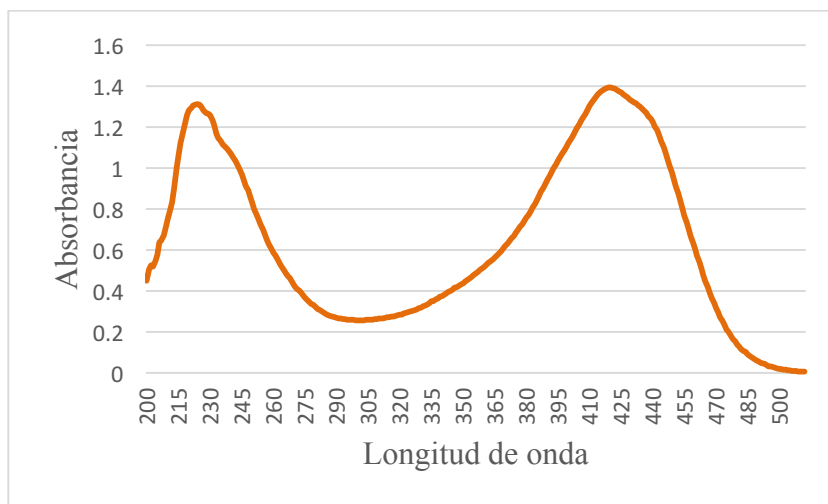


Figura 11. Espectro de absorción de radiación electromagnética UV/Vis del extracto etanólico de *C. longa* a 20 ppm disuelto en metanol.

La solución de curcumina en metanol (6 ppm) presentó una longitud de onda de máxima absorción a 421 nm, tal como se muestra en la siguiente gráfica.

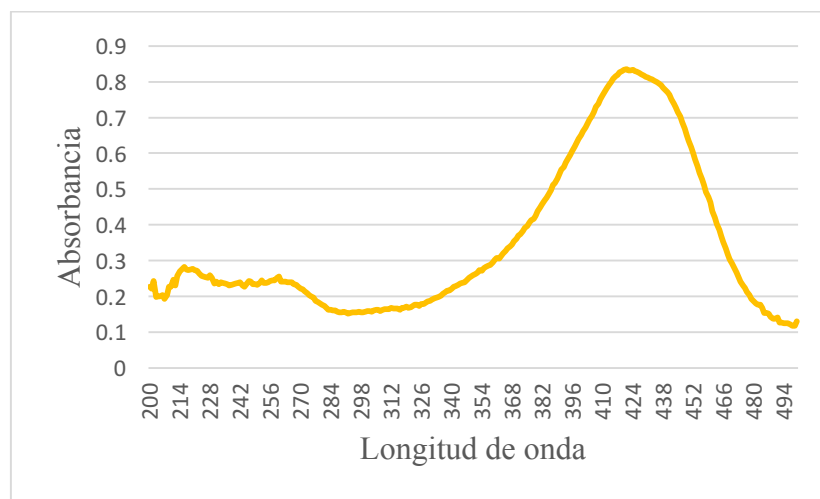


Figura 12. Espectro de absorción de radiación electromagnética UV/Vis de solución metanólica de curcumina a 6 ppm.

El extracto de *B. vulgaris* en una disolución metanólica (20 ppm) presentó su pico característico, una longitud de onda de máxima absorción de 349 nm, tal como se muestra en la siguiente gráfica.

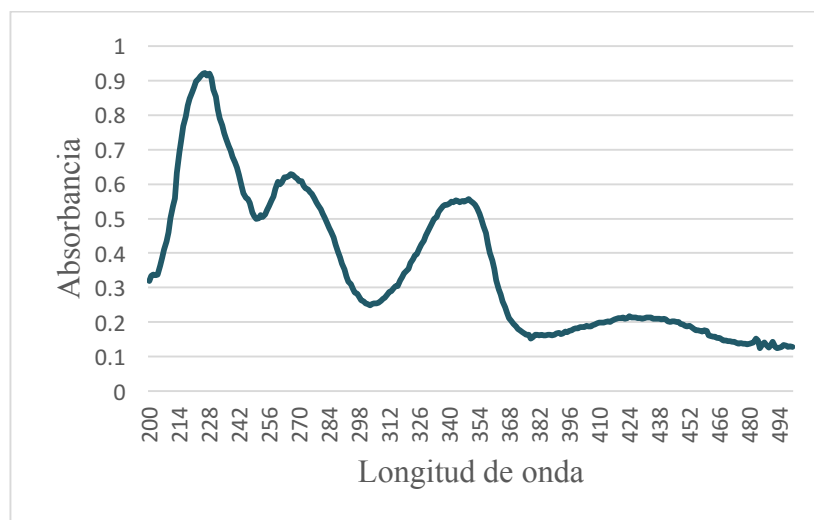


Figura 13. Espectro de absorción de radiación electromagnética UV/Vis del extracto metanólico de *B. vulgaris* a 20 ppm disuelto en metanol.

El cloruro de berberina tiene 4 picos característicos, para su cuantificación, se consideró la de λ de 349 nm. En la siguiente gráfica se muestra el barrido de absorción de la solución de cloruro de berberina a una concentración de 6 ppm.

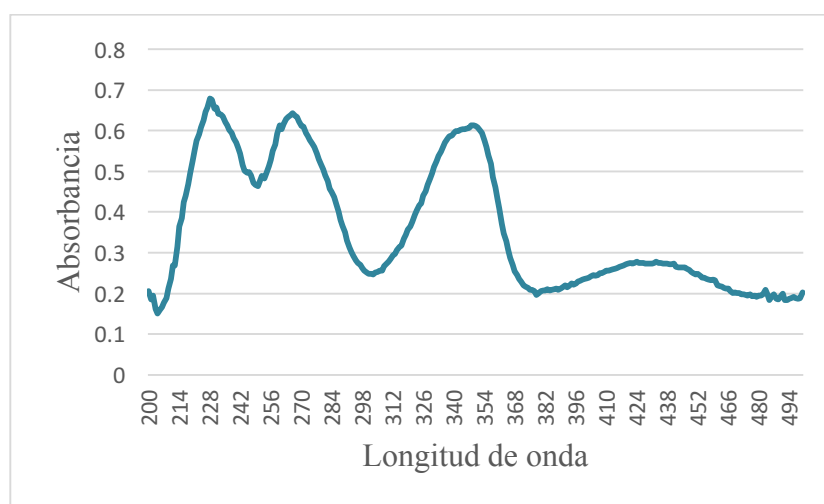


Figura 14. Espectro de absorción de radiación electromagnética UV/Vis de una solución metanólica de cloruro de berberina a 6 ppm.

7.3.2. Curva de calibración

Una vez obtenidos los picos característicos y λ_{max} de los analitos, se realizaron curvas de calibración con el fin de contar con un cálculo estimativo de la cantidad de activo presente en el extracto crudo. En las siguientes gráficas se muestran las curvas de calibración de curcumina y cloruro de berberina a sus λ correspondientes.

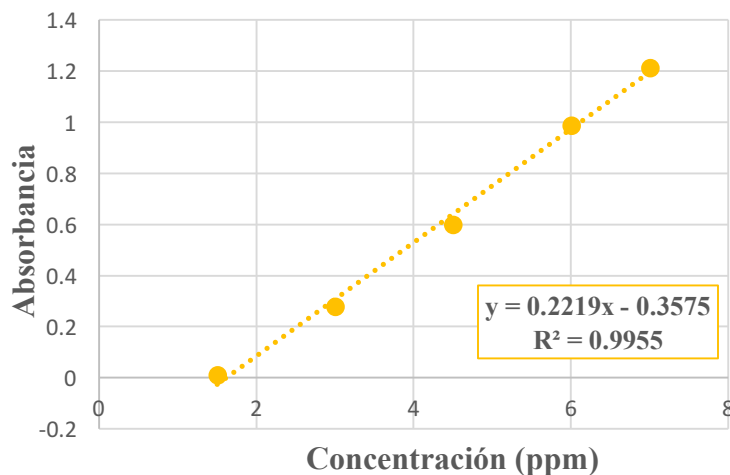


Figura 15. Regresión lineal de la curva de calibración de curcumina por espectrofotometría a una λ de 421 nm. En la gráfica se muestran los valores de la ecuación de la recta ($y = mx + b$), donde la pendiente es de 0.2219, una intersección de 0.3575 y un coeficiente de correlación de 0.9955 ($n=3$).

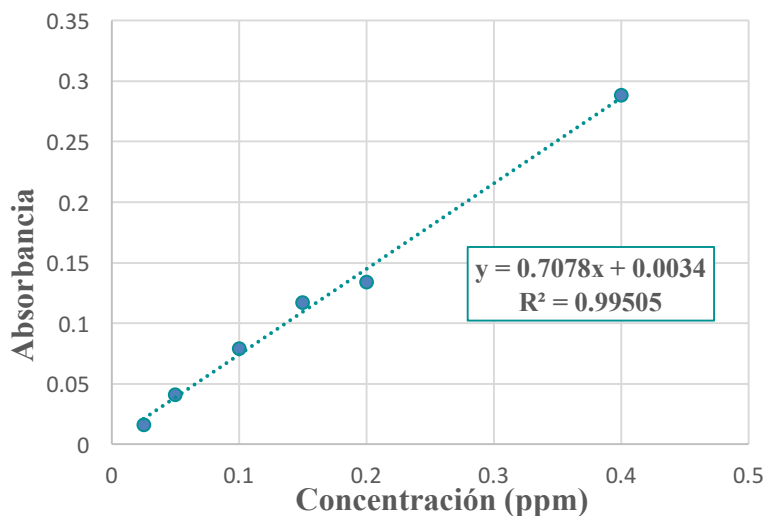


Figura 16. Regresión lineal de la curva de calibración de cloruro berberina por espectrofotometría a una λ de 349 nm. En la gráfica se muestran los valores de la ecuación de la recta ($y = mx + b$), donde la pendiente es de 0.7078, una intersección de 0.0034 y un coeficiente de correlación de 0.99505 ($n=3$).

También se realizó la curva de calibración del extracto crudo de *B. vulgaris* de dos lecturas una a 349 nm (Figura 17), donde la berberina es identificada y a 226 nm (Figura 18), donde se encuentra la λ_{\max} , y es ahí donde además de cuantificar berberina, se pueden cuantificar otros compuestos presentes en el extracto crudo.

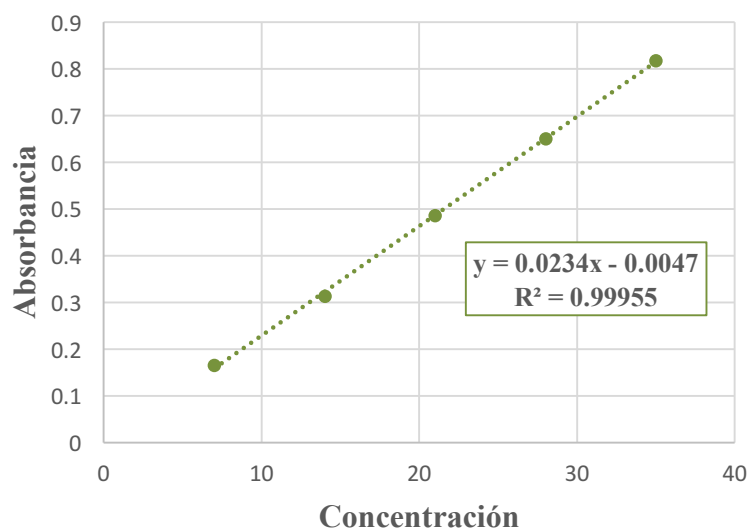


Figura 17. Regresión lineal de la curva de calibración del extracto metanólico crudo de *B. vulgaris* por espectrofotometría a una λ de 349 nm. En la gráfica se muestran los valores de la ecuación de la recta ($y = mx + b$), donde la pendiente es de 0.0234, una intersección de 0.0047 y un coeficiente de correlación de 0.99955 (n=3).

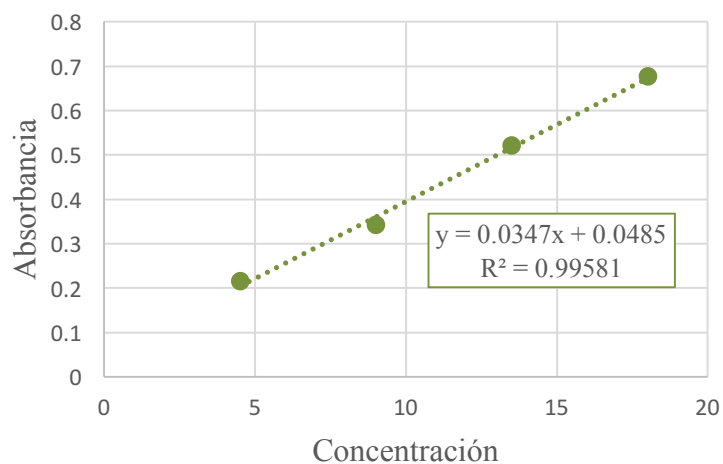


Figura 18. Regresión lineal de la curva de calibración del extracto metanólico crudo de *B. vulgaris* por espectrofotometría a una λ de 226 nm. En la gráfica se muestran los valores de la ecuación de la recta ($y = mx + b$), donde la pendiente es de 0.0347, una intersección de 0.0485 y un coeficiente de correlación de 0.99581 (n=3).

7.3.3. Cuantificación de activos presentes en los extractos crudos

Después de disolver cada extracto en metanol, se lleva al espectrofotómetro UV/Vis y al dar la lectura indicada para cada extracto, la absorbancia se sustituye en la ecuación de la recta dada por su respectiva curva de calibración. Después de que la ecuación es despejada, se obtiene una estimación de la concentración de curcumina (Tabla 6) y berberina (Tabla 7) presentes en los extractos crudos, así como también, la concentración de otros compuestos presentes en el extracto de *B. vulgaris* junto con la berberina.

Tabla 6. Estimación de la concentración de curcumina en el extracto etanólico crudo de *C. longa*.

λ	ABS	ppm	% curcumina en extracto
421 nm	0.6085	4.353	34.8

Tabla 7. Estimación de la concentración de berberina en el extracto metanólico crudo de *B. vulgaris*.

λ	ABS	ppm	% berberina en extracto
349 nm	0.4470	0.627	2.5

7.4. Estandarización de la obtención de nanopartículas

Antes de preparar los sistemas nanoparticulados con extracto, se obtuvieron las condiciones ideales para obtener el tamaño de nanopartícula deseado. Las siguientes gráficas muestran el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI), dependiendo la cantidad de agua utilizada en el método de nanoprecipitación. Los lotes se hicieron con 50 mg de polímero (Eudragit® EPO) disueltos en 5 mL de solvente orgánico metanol (Figura 19 y 20) o acetona (Figura 21 y 22). En las figuras 19-22 se muestran los tamaños de partícula y PDI de la suspensión, sobrenadante y pastilla del lote de nanopartículas. La suspensión es la mezcla homogénea de nanopartículas con agua y compuestos no encapsulados después de haber eliminado el solvente orgánico; la pastilla es el sólido presente en el fondo del tubo que resulta del proceso de centrifugación; y el sobrenadante

es la parte acuosa que resulta de la centrifugación que presentaría las nanopartículas mas pequeñas y compuestos no encapsulados.

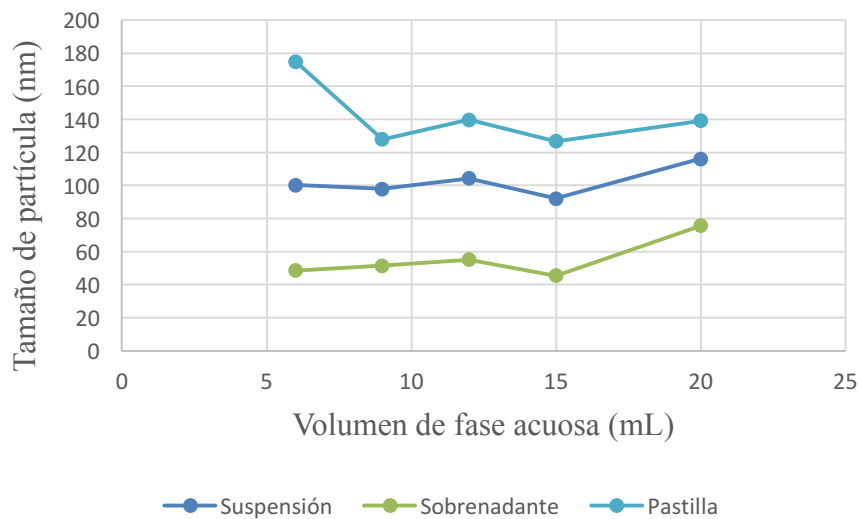


Figura 19. Tamaño de partícula en función del volumen de fase acuosa utilizada de suspensión, sobrenadante y pastilla. Método de nanoprecipitación con 50 mg del polímero Eudragit® EPO y 5 mL de metanol (n=3).

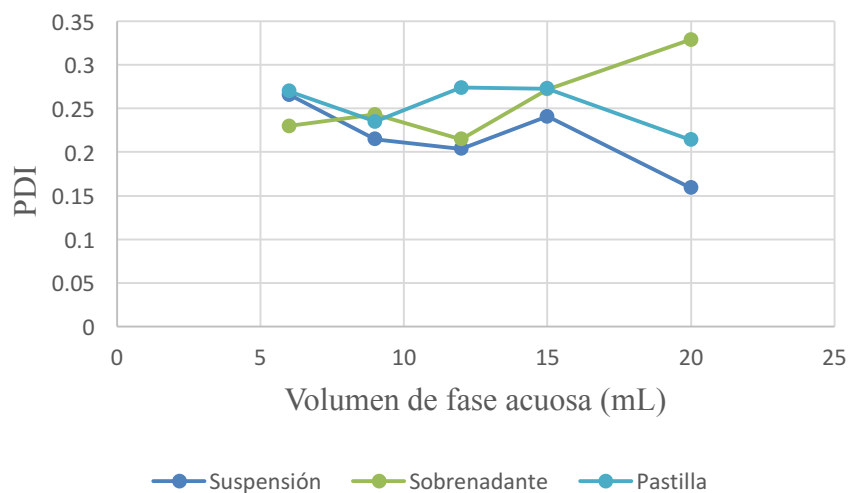


Figura 20. Índice de polidispersidad en función del volumen de fase acuosa utilizada de suspensión, sobre nadante y pastilla. Método de nanoprecipitación con 50 mg del polímero Eudragit® EPO y 5 mL de metanol (n=3).

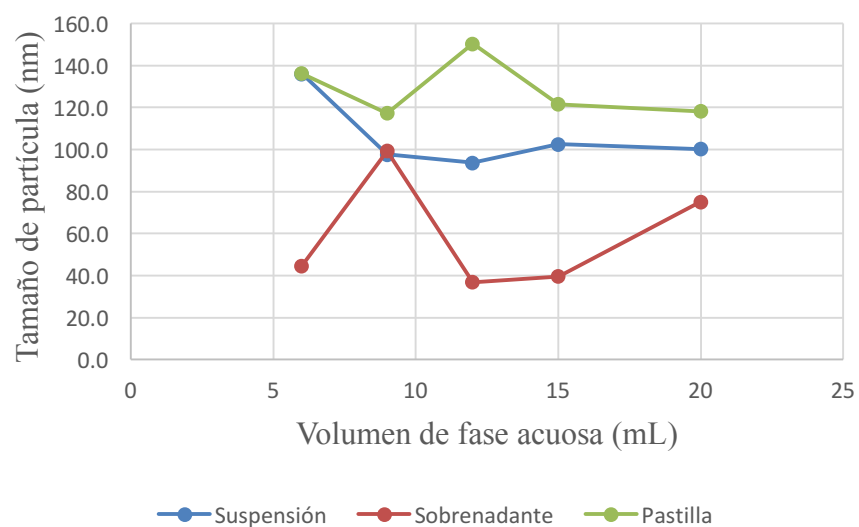


Figura 21. Tamaño de partícula en función del volumen de fase acuosa utilizada de suspensión, sobrenadante y pastilla. Método de nanoprecipitación con 50 mg del polímero Eudragit® EPO y 5 mL de acetona (n=3).

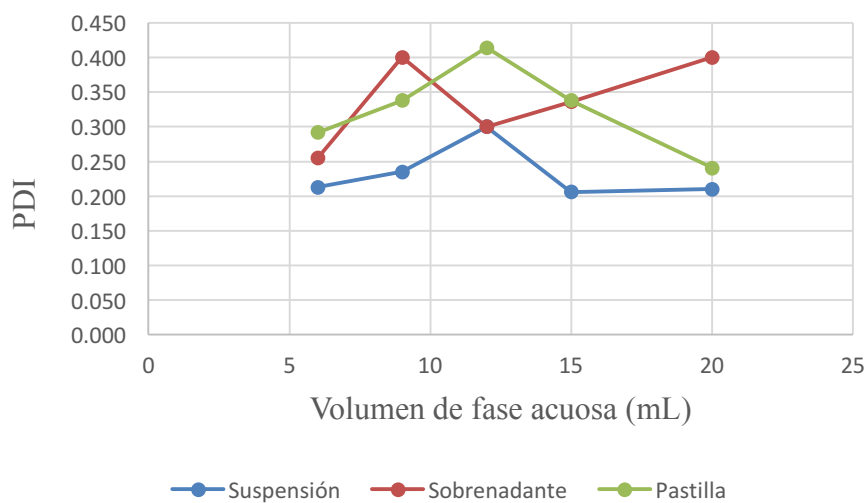


Figura 22. Índice de polidispersidad en función del volumen de fase acuosa utilizada de suspensión, sobre nadante y pastilla. Método de nanoprecipitación con 50 mg del polímero Eudragit® EPO y 5 mL de acetona (n=3).

7.5. Caracterización de las formulaciones de nanopartículas

Se lleva a cabo la caracterización de las formulaciones de NPP cargadas con los extractos lo cual incluye, tamaño y morfología, índice de polidispersidad (PDI), se identifican las fracciones de los extractos que fueron atrapadas por las nanopartículas y la eficiencia de atrapamiento de los activos.

7.5.1. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI)

La tabla 8 y las figuras 23 y 24, muestran el tamaño de partícula y el PDI de cada formulación, las cuales se obtienen con una fase orgánica de 50 mg de polímero Eudragit® EPO en 5 mL de disolvente orgánico, metanol para *B. vulgaris* y acetona para *C. longa*; y 9 mL de agua destilada en la fase acuosa.

Tabla 8. Tamaño de partícula y PDI de cada extracto incorporado en nanopartículas con polímero Eudragit® EPO.

Extracto	Tamaño	PDI
<i>C. longa</i>	142.1 nm	0.177
<i>B. vulgaris</i>	75.97 nm	0.190

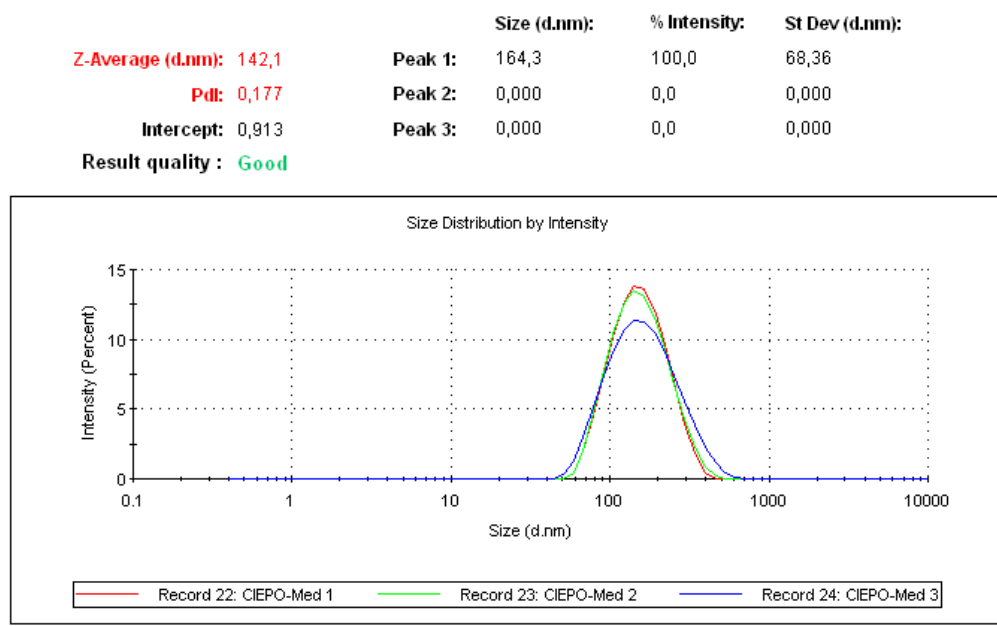


Figura 23. Determinación del tamaño de partícula y PDI por espectroscopía de correlación fotónica de las NPP de extracto de *C. longa* incorporado en polímero Eudragit® EPO.

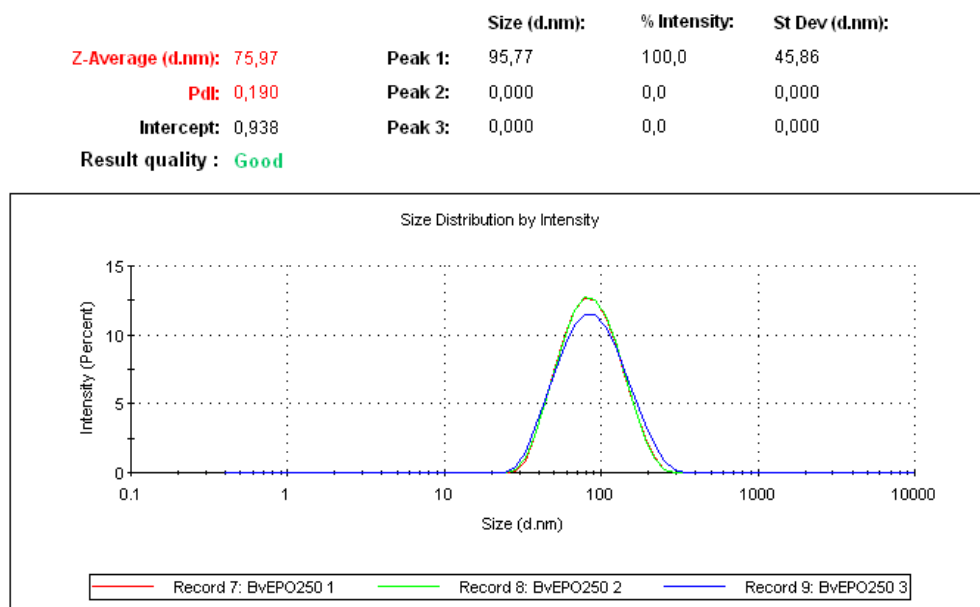


Figura 24. Determinación del tamaño de partícula y PDI por espectroscopía de correlación fotónica de las NPP de extracto de *B. vulgaris* incorporado en polímero Eudragit® EPO.

7.5.2. Morfología de las nanopartículas

Se confirma la presencia y el tamaño de las NPP mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) donde, además se determinó su morfología. Las NPP presentan forma semiesférica y superficie lisa como se muestran en las figuras 25-28.

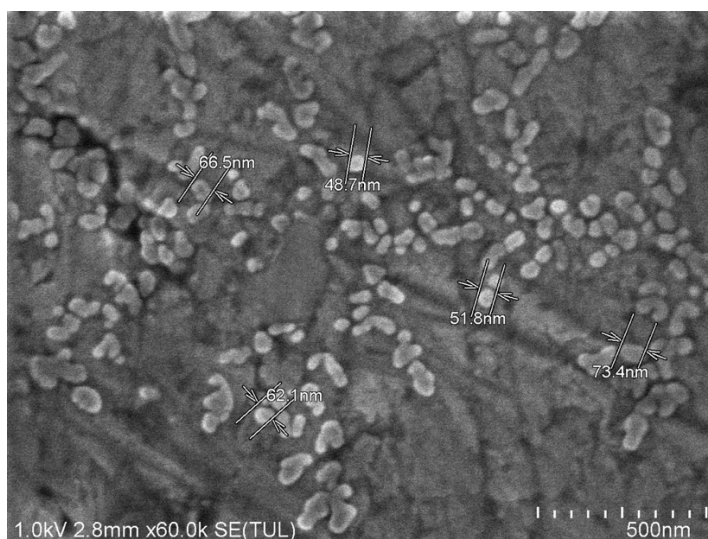


Figura 25. Imagen obtenida por MEB de NPP con extracto etanólico de *C. longa* incorporado.
Se muestra la morfología y el tamaño de partícula.

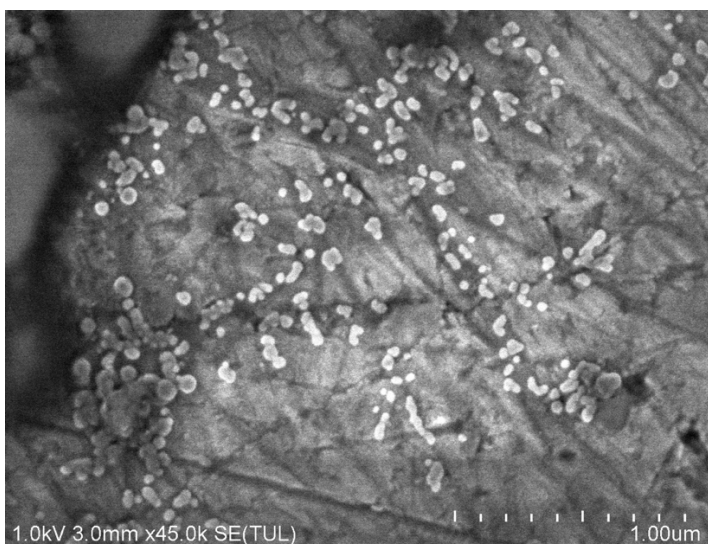


Figura 26. Imagen obtenida por MEB de NPP con extracto etanólico de *C. longa* incorporado.
Se muestra la morfología con tendencia a esfera.

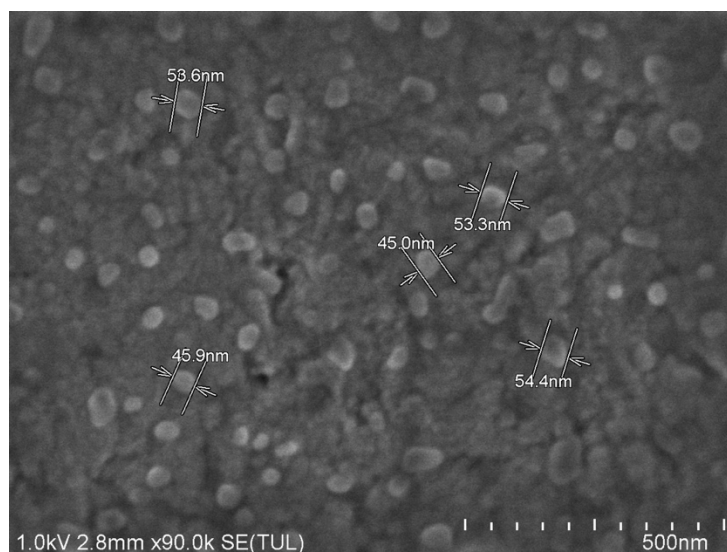


Figura 27. Imagen obtenida por MEB de NPP con extracto metanólico de *B. vulgaris* incorporado.
Se muestra la morfología y el tamaño de partícula.

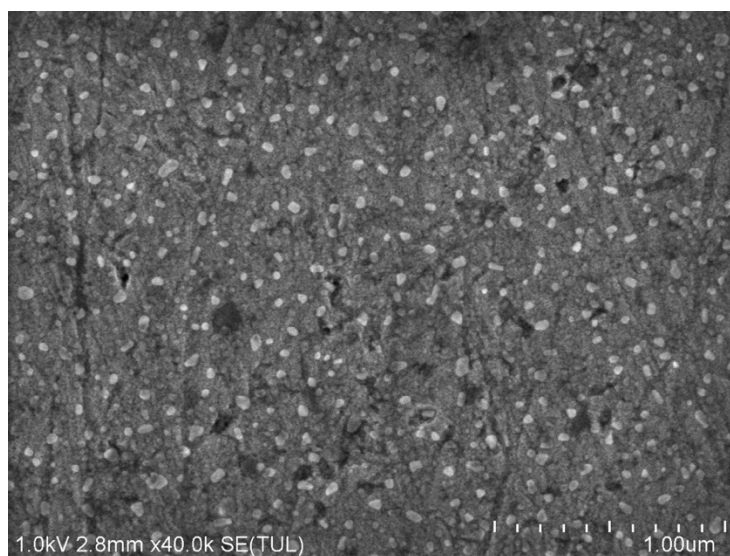


Figura 28. Imagen obtenida por MEB de NPP con extracto metanólico de *B. vulgaris* incorporado.
Se muestra la morfología con tendencia a esfera observando una población de partículas
con tamaños homogéneos.

7.5.3. Identificación de fracciones incorporadas en las nanopartículas

Las cromatografías de capa fina comparan de forma cualitativa el componente más representativo de cada extracto en grado estándar, el extracto crudo y la formulación de nanopartículas de cada extracto.

Para separar las fracciones de *B. vulgaris* se usó cloroformo - metanol - ácido acético (7:2:1); por cada 10 mL de fase móvil, se adicionan 400 µL de agua destilada. Para separar las fracciones del extracto de *C. longa*, se usó cloroformo - Ácido acético (9:1).

Así mismo, se realizó una cromatografía con el polímero Eudragit® EPO en las proporciones empleadas en las formulaciones de nanopartículas para confirmar que no influyera en la separación de las fracciones y, efectivamente el polímero no corrió (Rf 0).

En la figura 29, se muestra la cromatografía donde se observa la banda del estándar de berberina la cual presentó un Rf de 0.824 (a), el extracto de *B. vulgaris* muestra una banda a el mismo Rf de 0.824 (b), mientras que la separación cromatográfica de la formulación de nanopartículas con extracto de *B. vulgaris* presenta una banda importante con un Rf de 0.756 (c), lo que indica que esta fracción posiblemente pertenece a un compuesto diferente a la berberina, el cual fue encapsulado.

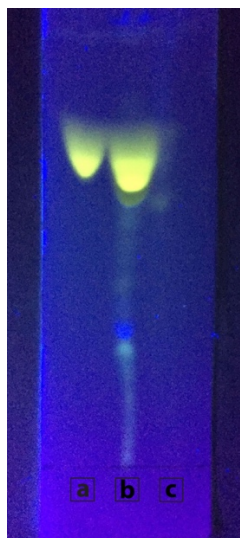


Figura 29. Cromatografía de capa fina vista con lámpara UV: a) Cloruro de berberina, b) Extracto crudo de *B. vulgaris*, c) Fracción atrapada en la formulación de *B. vulgaris* en nanopartículas.

En la figura 30, se muestra la cromatografía donde se observa la separación cromatográfica del estándar de curcumina, la cual contiene tres bandas características (Rf 0.282, Rf 0.507 y Rf 0.704). Así mismo, el extracto de *C. longa* y la formulación de

nanopartículas con este mismo extracto, contienen las tres bandas con los mismos Rf, lo cual indica que la curcumina ha sido encapsulada en las nanopartículas.

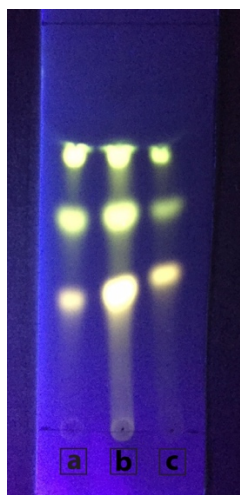


Figura 30. Cromatografía de capa fina vista con lámpara UV: a) Curcumina, b) Extracto crudo de *C. longa*, c) Fracción atrapada en la formulación de *C. longa* en nanopartículas.

7.5.4. Eficiencia de encapsulación del sistema nanoparticulado

Después de llevar a cabo el barrido de absorción para encontrar la λ_{\max} y/o pico característico de curcumina y berberina, se obtuvo una λ_{\max} en 421 nm para la solución de curcumina en metanol como se muestra en la figura 12, y una λ que representa el pico característico de berberina en solución metanólica en 349 nm como se muestra en la figura 14.

Con los valores obtenidos se realizaron las curvas de calibración de cada activo con el fin de calcular la concentración del activo principal del extracto presente en la formulación de nanopartículas. Para la curva de calibración de curcumina, se realizó la lectura de las diluciones en el espectrofotómetro UV/Vis en la λ de 421 nm para obtener la ecuación de la pendiente como lo muestra la figura 15. Se realizaron dos curvas de calibración para berberina, una a 349 nm para así, obtener la ecuación de la pendiente como lo muestra la figura 16, y otra a 226 nm para obtener la ecuación de la pendiente como lo muestra la

figura 18. Posteriormente, con los datos obtenidos en la ecuación de la pendiente de la curva, se sustituye la señal de la muestra dada por el espectrofotómetro.

Las suspensiones de nanopartículas purificadas fueron centrifugadas a 25,000 rpm por 3 horas y posteriormente el pellet obtenido fue congelado y liofilizado. Se tomaron 4 mg del pellet liofilizado y se disolvieron en metanol y se aforó a 10 mL, para así disolver el polímero, liberar el activo y éste poder ser cuantificado. Lo mismo se realizó con el sobrenadante resultante de la centrifugación y como blanco, se pesaron 4 mg del polímero Eudragit® EPO en 10 mL de metanol. A partir de la señal obtenida en el espectrofotómetro se realizaron cálculos para determinar la cantidad de activo atrapado.

En las tablas 9 y 10, se muestran los resultados de los cálculos obtenidos a partir de la sustitución de la señal de absorbancia dada por el espectrofotómetro en la ecuación de la recta dada por la curva de calibración para cada estándar de interés. La tabla 9, muestra la eficiencia de encapsulación de curcumina en el sistema nanoparticulado con extracto de *C. longa* y la tabla 10, muestra la eficiencia de encapsulación de cloruro de berberina y otros compuestos aún no identificados en el sistema nanoparticulado con extracto de *B. vulgaris*.

Tabla 9. Características del sistema nanoparticulado con extracto de *C. longa*.

Longitud de onda (nm)	421
Señal (Abs)	0.978
Concentración curcumina (ppm)	6.018
µg curcumina/lote	789.9
Eficiencia de encapsulación (%)	31.60
Encapsulado (% p/p)	1.505
Curcumina total encapsulada (%) (Del total en el extracto)	91

Tabla 10. Características del sistema nanoparticulado con extracto de *B. vulgaris*.

Longitud de onda (nm)	349	226
	Berberina	Berberina + otros compuestos
Señal (Abs)	0.036	0.213
Concentración (ppm)	0.046	4.741
µg/lote	6.045	622.21
Eficiencia de encapsulación (%)	-	24.9
Encapsulado (% p/p)	0.012	1.185
Total encapsulado (%) (Del total en el extracto)	9.7	-

7.6. Cinéticas de crecimiento

Se realizaron las cinéticas de crecimiento de *E. histolytica* y *T. vaginalis*, ésto para determinar la fase logarítmica, es decir, el punto óptimo de crecimiento que indica que hay mayor número de trofozoítos. Se observó que *E. histolytica* presentó un tiempo de generación de 6.29 h y tiempo de duplicación de 4.34 h, por lo que a las 72 h se encuentra en su fase exponencial (Figura 31). *T. vaginalis* tiene un tiempo de generación más corto con 5.82 h y el tiempo de duplicación de 4.01 h, por lo que su fase exponencial es de 48 h (Figura 32).

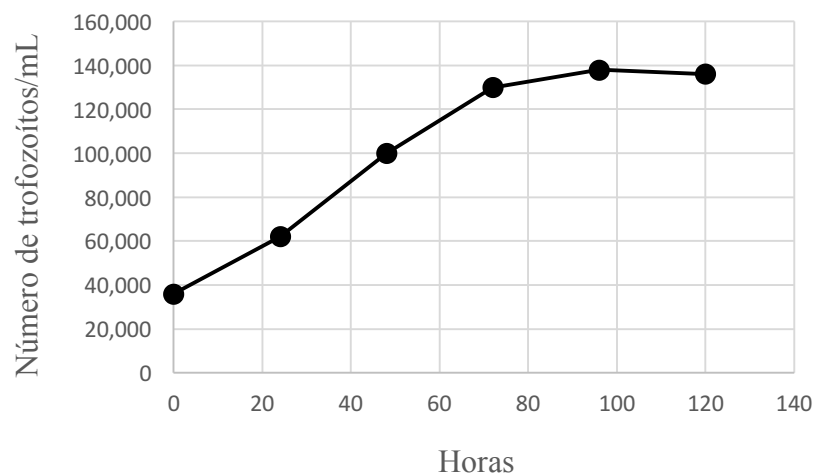


Figura 31. Cinética de crecimiento de *E. histolytica* inoculando 20,000 trofozoítos en 5 mL de medio basal TYI-S-33 adicionado con 10% de suero bovino a 36.5°C.

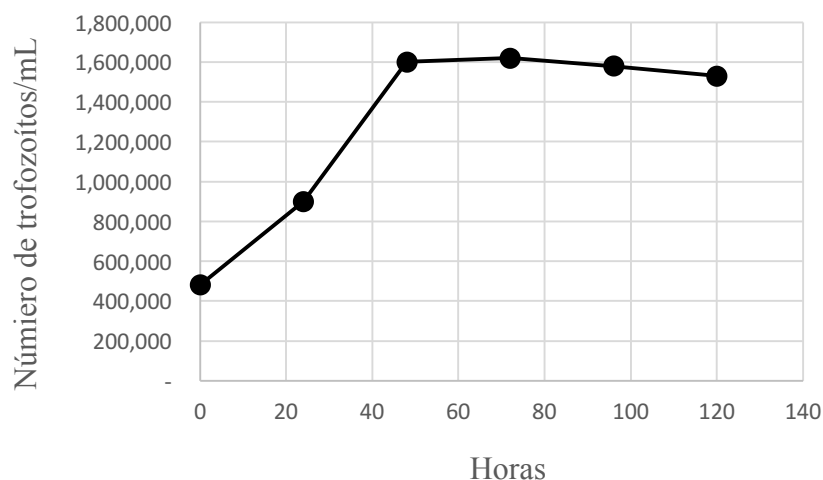


Figura 32. Cinética de crecimiento de *T. vaginalis* inoculando 100,000 trofozoítos en 5 mL de medio basal TYI-S-33 adicionado con 10% de suero bovino a 36.5°C.

7.7. Ensayo biológico

Mediante el análisis estadístico Probit, se obtuvo la concentración inhibitoria media (CI_{50}) tanto de los extractos libres, como de los extractos incorporados en el sistema nanoparticulado contra *T. vaginalis* (tabla 11) y *E. histolytica* (tabla 12).

Tabla 11. Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) para cada extracto libre, extracto incorporado en nanopartículas y metronidazol contra *T. vaginalis*.

	<i>T. vaginalis</i>	
	Extracto libre	Extracto en NP
CI ₅₀ <i>B. vulgaris</i>	192 ppm	40 ppm
CI ₅₀ <i>C. longa</i>	496 ppm	102 ppm
CI ₅₀ Metronidazol	0.06 ppm	

Tabla 12. Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) para cada extracto libre, extracto incorporado en nanopartículas y metronidazol contra *E. histolytica*.

	<i>E. histolytica</i>	
	Extracto libre	Extracto en NP
CI ₅₀ <i>B. vulgaris</i>	34 ppm	26 ppm
CI ₅₀ <i>C. longa</i>	38 ppm	19 ppm
CI ₅₀ Metronidazol	0.13 ppm	

En esta investigación sólo se pretende comparar el tratamiento de extracto crudo contra el tratamiento el extracto incorporado en NPP independientemente para cada planta en cada protozoario.

Para poder confirmar si existe diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones inhibitorias medias de los tratamientos para la actividad antiprotozoaria, se comparan los límites inferior y superior de la CI₅₀ del extracto libre con la CI₅₀ del extracto incorporado en NPP. Estos datos fueron obtenidos por el análisis Probit (SPSS versión 17) calculados con un 95% de límites de confianza. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 13. Comparación de los límites inferior y superior de cada tratamiento.

				95% de límites de confianza	
Tratamientos			CI ₅₀ (ppm)	Límite inferior	Límite superior
1	<i>T. vaginalis</i> con <i>C. longa</i>	Extracto libre	496 (a)	349.148	939.679
		Extracto en NPP	102 (b)	93.655	110.589
2	<i>T. vaginalis</i> con <i>B. vulgaris</i>	Extracto libre	192 (a)	174.307	211.898
		Extracto en NPP	40 (b)	37.042	44.059
3	<i>E. histolytica</i> con <i>C. longa</i>	Extracto libre	38 (a)	17.399	57.808
		Extracto en NPP	19 (a)	3.990	43.836
4	<i>E. histolytica</i> con <i>B. vulgaris</i>	Extracto libre	34 (a)	7.006	61.491
		Extracto en NPP	26 (a)	12.726	40.881

* Tratamientos 1, 2, 3 y 4 son independientes. Letras diferentes en un mismo tratamiento (un parásito y una planta) significa que los tratamientos presentan diferencia significativa.

Tanto el extracto de *C. longa* como el extracto de *B. vulgaris* presentaron actividad antiprotozoaria contra *T. vaginalis* y *E. histolytica* siendo mas efectivos contra *E. histolytica*. Sin embargo, cuando los extractos son incorporados en un sistema nanoparticulado, la CI₅₀ disminuye en todos los casos. Estadísticamente presentan diferencia significativa los dos tratamientos contra *T. vaginalis* con las dos plantas (*C. longa* y *B. vulgaris*) cuando se comparan las concentraciones inhibitorias medias del tratamiento del extracto libre con el tratamiento con extracto en NPP.

8. DISCUSIÓN

Las enfermedades causadas por protozoarios son responsables de una considerable morbilidad y mortalidad en todo el mundo, especialmente en países en vía de desarrollo. *T. vaginalis* y *E. histolytica* están entre los parásitos de interés clínico que causan enfermedades con amplia distribución mundial (OMS, 2008), las cuales han sido más comúnmente tratadas con metronidazol. A pesar de que el metronidazol es una molécula efectiva, se ha observado el aumento de los fracasos del tratamiento en estas enfermedades, así como también, el desarrollo de resistencia, lo cual es un motivo de preocupación (Jarrad et al., 2016).

Otra opción para el tratamiento de cepas resistentes al metronidazol, es un tratamiento más prolongado y/o con dosis más altas. A pesar de que este fármaco en la mayoría de los casos es bien tolerado, puede causar efectos secundarios severos, entre ellos incluyen náusea, diarrea, sabor metálico en la boca en dosis normales, sin embargo, en dosis altas, causa el desarrollo de leucopenia y neutropenia. Además, se conoce que el metronidazol causa graves trastornos neurológicos y puede ser tóxico para el sistema nervioso central aparentemente sin importar la dosis y la duración del tratamiento (Kuriyama et al., 2011; Chacko, et al., 2011). Es mutagénico en bacterias y carcinogénico en ratones (Connor et al., 1977; Lindmark y Muller, 1976).

E ahí la importancia de encontrar alternativas para el tratamiento de *T. vaginalis* y *E. histolytica*. Para ello se plantean dos estrategias, la primera es la búsqueda de nuevos principios activos y la segunda es la búsqueda de nuevas formas de administración y sistemas de liberación. En este trabajo se incluyeron las dos estrategias, usando extractos de plantas en sistemas nanométricos acarreadores de fármacos, específicamente en NPP.

Curcumina, compuesto activo presente en el rizoma de la planta *C. longa*, se le ha encontrado actividad antiprotozoaria *in vitro* contra leishmania (Hosseini, 2012), malaria, *G. lamblia* (Pérez-Arriaga et al., 2006; Said et al. 2012), *T. vaginalis* (Wachter, 2014) y *Trypanosoma brucei* (Changtam et al., 2010). En el caso de berberina, compuesto activo presente en la planta *B. vulgaris*, se le considera con un potencial antiparasítico contra *E.*

histolytica, *G. lamblia*, *T. vaginalis* (Wright et al. 2000; Freile, 2003), malaria y algunas especies de *Leishmania spp.* (Aghbashlo et al., 2008).

A pesar de que la curcumina y la berberina son compuestos que presentan buena actividad antiprotozoaria y sin toxicidad a altas concentraciones, son moléculas con muy baja biodisponibilidad, la curcumina no es soluble en agua y se degrada rápidamente en pH alcalino (Tönnesen y Karlsen, 1985) y la berberina tiene muy baja estabilidad debido a baja solubilidad (Mehra et al., 2016). Estas características limitan sus potenciales usos farmacéuticos, por lo tanto, los extractos fueron incorporados en sistemas nanométricos como lo son las NPP y así, proponer un agente antiparasitario mejorado.

Primero se obtuvieron los extractos del rizoma de *C. longa* y de raíz de *B. vulgaris*. La extracción de *C. longa* se llevó a cabo siguiendo la metodología de Sogi et al. (2010) mediante la cual obtuvieron rendimientos de curcumina que van desde 4.49% a 12.89%, este último siendo el mejor rendimiento obtenido con los parámetros de temperatura y tiempo de extracción en 60 °C por 30 min, respectivamente, trabajando con un tamaño de partícula del material vegetal de 0.42 mm, y empleando como disolvente extractante etanol absoluto. El rendimiento de extracto crudo que se obtuvo en el presente trabajo fue de 8.86% del cual, 34.8% se conforma de curcumina. En el caso de la extracción de *B. vulgaris*, se llevó a cabo mediante el método utilizado por Ramesh babu et al. (2012) donde los parámetros utilizados fueron 24 h de maceración en frío a -20°C y así, obtuvieron rendimientos de berberina de 4.06%, 1.02% y 3.21%, dependiendo el secado del material vegetal antes de la extracción, si fue en la sombra, en un horno y con el sol, respectivamente. En el presente trabajo se obtuvo un rendimiento del extracto crudo de 2.33% del cual, 2.5% es berberina. Las diferencias entre los rendimientos obtenidos por los trabajos anteriores y el presente podrían darse por la obtención y el proceso del material vegetal, mientras que Sogi et al. (2010) y Ramesh babu et al. (2012) obtuvieron la planta fresca y fue procesada por ellos mismos, en este trabajo se obtuvo comercialmente como polvo.

Para cuantificar la concentración de la curcumina y la berberina presentes en los extractos de *C. longa* y de *B. vulgaris* respectivamente, se realizaron tres pasos: un barrido de absorción, curvas de calibración y la sustitución de la señal dada por espectrofotometría UV/Vis en la ecuación de la curva.

Primero se llevó a cabo un barrido de absorción con un espectrofotómetro UV/Vis para encontrar la λ_{max} y/o pico característico de los activos de curcumina y cloruro de berberina y posteriormente se realizaron los barridos de absorción de los extractos de *C. longa* y *B. vulgaris*, para obtener un perfil general de sus principales compuestos.

El extracto de *C. longa* disuelto en metanol, presentó una λ_{max} en 421 nm. Esta longitud de onda permite suponer la presencia de curcumina ya que en diferentes trabajos de investigación también usan esta absorción máxima, tal como Hazra et al. (2015) para cuantificar curcumina en nanoformulaciones.

El barrido de absorción de cloruro de berberina tiene 4 picos característicos que han sido reportados por otros investigadores previamente, mismos que se pueden apreciar en los resultados obtenidos que se encuentran representados en la figura 14. Para la cuantificación de este analito en el extracto y en las formulaciones de nanopartículas, se consideró la λ de 349 nm debido a que suele ser la más empleada por presentar una meceta más prolongada. De forma similar, Latif et al. (2010) y Pasrija et al. (2010) para cuantificar berberina en sus experimentos usaron la λ de 346 nm, aunque trabajan con plantas diferentes a las empleadas en la presente investigación, también contienen berberina, y en su caso, los extractos fueron disueltos en agua de rosas y metanol, respectivamente.

Los principales compuestos bioactivos de *B. vulgaris* son alcaloides (berberina, berbamina, jatrorrhicina, columbamina, berberubina, oxiacantina, palmarina), vitamina C, resina y taninos, pero también flavonoides como quercetina y kaempferol (Ciulei et al., 1993; Suau et al. 1998). Los alcaloides presentes en la planta son alcaloides isoquinolínicos, por lo tanto, presentan una estructura química muy similar así que, sabiendo que la berberina tiene un pico característico en 226 nm, podría ser que los

compuestos no identificados sean también alcaloides. Esto se confirma mediante las pruebas fitoquímicas (Dragendorff) realizadas donde se confirma la presencia de alcaloides en este extracto.

Una vez obtenidos los extractos y antes de realizar las formulaciones de NPP, se llevó a cabo una estandarización de los parámetros del método de preparación, para así obtener el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI) deseados de nuestras formulaciones. Se busca un tamaño de partícula menor a 200 nm, ya que a menor tamaño, mayor superficie de área de contacto para las interacciones (Banerjee, 2016), además, si llegara a ser requerido, este tamaño permite su esterilización por filtración. El PDI es un parámetro obtenido de manera simultánea con el tamaño de partícula. Este índice provee información sobre la muestra: valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa así como valores cercanos a la unidad indican que la muestra presenta gran variedad de tamaños (Lancheros et al., 2014). En este estudio se buscaban poblaciones muy homogéneas, por lo tanto, un PDI menor de 0.2. Los parámetros encontrados que nos brindan las características deseadas fueron 50 mg de polímero y 5 mL de solvente para la fase orgánica, y 9 mL de agua para la fase acuosa.

Una vez obtenidos los parámetros para el método de nanoprecipitación se lleva a cabo la preparación de los sistemas nanoparticulados. Existen diversos trabajos que hablan de NPP con los activos berberina y curcumina, usando diferentes métodos de preparación, así como también diferentes polímeros y tensoactivos para obtener diferentes nanoestructuras, sin embargo, de la incorporación de extractos crudos en NPP hay poco documentado. Existen otras clases de nanopartículas, como por ejemplo lo reportado por Shabanzadeh et al. (2013), donde muestra la producción de nanopartículas de plata con extracto acuoso de *C. longa* y en 2010, Hadaruga et al., sintetizaron y caracterizaron complejos de nanopartículas con β -ciclodextrina y extracto de *B. vulgaris*.

En este trabajo, mediante el método de nanoprecipitación, se lograron producir NPP dónde se incorporan los extractos crudos de *B. vulgaris* y *C. longa* de manera independiente, utilizando el copolímero catiónico Eudragit® EPO, el cual, químicamente

es poli (butil metacrilato-co-(2-dimetilaminoetil) metacrilato-co-metil metacrilato. El polímero Eudragit® EPO es grado farmacéutico el cual está aprobado para su administración oral y, al ser un polímero sintético no biodegradable, brinda mayor pureza, estabilidad y reproducibilidad a las formulaciones, comparado con los polímeros naturales, así como también, puede ser modificado de acuerdo con los requisitos (Khoee y Yaghoobian, 2009).

Las formulaciones de NPP fueron caracterizadas, lo cual incluyó, tamaño y morfología de la partícula, índice de polidispersidad (PDI), identificación de las fracciones de los extractos que fueron atrapadas y la eficiencia de atrapamiento de los activos.

Las nanopartículas que contienen extracto de *B. vulgaris* se obtuvieron con un tamaño de 76 nm y un PDI de 0.190, mientras que las que contienen extracto de *C. longa*, tuvieron un tamaño de 142.1 nm con un PDI de 0.177. Estos resultados fueron reproducibles y cumplen el objetivo de tener un tamaño de partícula de menor a 200 nm y PDI menor a 0.2. La medición se llevó a cabo mediante espectroscopía de correlación fotónica.

Mediante microscopía electrónica de barrido, se confirma la presencia de NPP con forma semiesférica y superficie lisa. El tamaño encontrado se confirma con el obtenido por la espectroscopía de relación fotónica.

Existen diferentes trabajos los cuales han preparado NPP encapsulando diferentes activos para una variedad de aplicaciones obteniendo tamaños de partícula en el mismo rango, por ejemplo, Cetin et al. (2010) realizaron diferentes formulaciones de NPP con el polímero Eudragit® L-100 incorporando diclofenaco sódico con el fin de obtener un sistema de liberación controlada y, obtuvieron un tamaño de partícula de 274 nm. Khachane et al. (2011) incorporaron meloxicam en NPP con el polímero Eudragit® EPO para poder reducir la ulcerogenesis del compuesto y, obtuvieron un tamaño de partícula de 95.4 nm. Anand et al. (2011) incorporaron curcumina en NPP con PLGA para mejorar la biodisponibilidad y aumentar la actividad biológica contra células cancerígenas, obteniendo un tamaño de partícula de 80.9 nm.

Las fracciones atrapadas en el sistema nanoparticulado se aprecian de manera cualitativa mediante cromatografía en capa fina, comparando el estándar del activo, el extracto crudo y su correspondiente formulación de nanopartículas. Primero se realizó una corrida con el polímero Eudragit® EPO para confirmar que éste no afecte en la separación de las fracciones. El polímero presentó un Rf de 0.

En la cromatografía de curcumina, extracto de *C. longa* y nanopartículas con el mismo extracto, se puede observar la presencia de curcumina en tres fracciones, lo que indica la presencia del activo curcumina en el sistema nanoparticulado. Por el otro lado, en la cromatografía de berberina, extracto de *B. vulgaris* y nanopartículas con el mismo extracto, se observa la presencia de berberina en el extracto crudo comparado con el estándar (Rf de 0.824) y no es visible en el sistema nanoparticulado, sin embargo, se observa una banda importante con un Rf de 0.756 la cual también se encuentra presente en el extracto crudo de *B. vulgaris* y esto indica que es un compuesto diferente a la berberina el cual ha sido encapsulado en las nanopartículas.

La última parte de la caracterización de la formulación de nanopartículas es calcular la eficiencia de atrapamiento de los activos. Después de haber llevado a cabo el barrido de absorción para encontrar la λ_{\max} y/o pico característico de curcumina (421 nm) y berberina (349 nm), se realizaron las curvas de calibración de cada activo con el fin de calcular la concentración del activo principal del extracto presente en la formulación de nanopartículas. Para la curva de calibración de curcumina, se realizó la lectura de las diluciones en el espectrofotómetro UV/Vis en la λ de 421 nm y se realizaron dos curvas de calibración para berberina, una a 349 nm y otra a 226 nm, la cual fue la longitud de máxima absorción para el extracto crudo. Al obtener las señales dadas por el espectrofotómetro UV/Vis de las formulaciones de nanopartículas, se determinó la cantidad de activo presente atrapado al sustituir esta señal en la ecuación dada por la curva de calibración.

En el sistema nanoparticulado con extracto de *C. longa*, se obtuvo el 31% de eficiencia de atrapamiento. De toda la cantidad de curcumina presente en el extracto de *C. longa* se estima que aproximadamente el 91% fue encapsulada. Chidambaram y Krishnasamy en 2014, encapsularon complejos del activo curcumina con quercetina, piperina y silibina por el método de nanoprecipitación con modificaciones usando el polímero poli(butil metacrilato-co-(2-dimetilaminoetil) metacrilato-co-metil metacrilato) y β -ciclodextrina, así pudieron obtener porcentajes de eficiencia de atrapamiento de entre 74% y 98.5%. Ellos presentan un alto porcentaje de atrapamiento el cual pudo haber sido por el uso de Poloxamer 188, un tensoactivo, sin embargo, se tiene que tomar en cuenta que ellos trabajaron con compuestos puros y en nuestras formulaciones, con extractos crudos, en las cuales sólo se ha cuantificado el activo principal, la curcumina, así mismo puede haber otros compuestos presentes en el extracto crudo que también fueron atrapados y no han sido cuantificados.

En el sistema nanoparticulado con extracto de *B. vulgaris* se calculó que el 9.7% de berberina presente en el extracto fue atrapada. Debido a que los resultados mostraron que en la composición del extracto se estima que el 2.54% es berberina y tras la cuantificación de lo incorporado se encontró que del total de la berberina inicial presente, el 9.7% fue incorporado, por lo tanto, es posible que del extracto completo presumiblemente también se tenga esta eficiencia de encapsulación. Posteriormente, se realizó la lectura a 226 nm, para obtener el porcentaje de eficiencia de atrapamiento de compuestos que se leen a esta λ , la cual fue la λ_{max} en el barrido de absorción del extracto de *B. vulgaris* y lo cual indica, que ahí se encuentra una gran parte de compuestos en el extracto. Por lo tanto, se obtuvo un porcentaje de atrapamiento del 24.9%, lo cual pertenece a compuestos que incluyen la berberina y otros no identificados por nosotros aún. Hadaruga et al. en 2010, encapsularon extracto de *B. vulgaris* en β -ciclodextrina obteniendo un rendimiento de encapsulación del 76.7%, siendo este método más eficiente que el nuestro, sin embargo, utilizar los polímeros Eudragit® presentan mayores ventajas a nivel farmacéutico y pueden ser modificados de acuerdo con los requisitos (Khoee y Yaghoobian, 2009), por ejemplo, manipularlo para que pueda ser pH dependiente.

Se llevaron a cabo los ensayos biológicos con el método establecido por Mata et al. (2008), realizando los experimentos con el extracto libre de las plantas *C. longa* y *B. vulgaris* (por separado) y el lote completo de las formulaciones de nanopartículas contra *T. vaginalis* y *E. histolytica*. Por medio del análisis estadístico Probit, se obtuvieron las concentraciones inhibitorias medias de cada tratamiento. Para el tratamiento de *B. vulgaris* contra *T. vaginalis* (tabla 11), la IC_{50} del extracto libre fue de 192 ppm y la del extracto incorporado en NPP disminuyó a 40 ppm; en el tratamiento con *C. longa* (tabla 11) la IC_{50} del extracto libre fue de 496 ppm y el extracto incorporado en NPP disminuyó a 102 ppm. Para el caso del tratamiento contra *E. histolytica* con *B. vulgaris* (tabla 12), la IC_{50} del extracto libre fue de 34 ppm y al ser incorporado en NPP disminuyó a 26 ppm y, por último, el tratamiento con *C. longa* (tabla 12), la IC_{50} del extracto libre fue de 38 ppm y con su incorporación en NPP, la IC_{50} disminuyó a 19 ppm. Por lo tanto, se encuentra que tanto el extracto de *C. longa* como el extracto de *B. vulgaris* presentaron actividad antiprotozoaria contra *T. vaginalis* y *E. histolytica* siendo mas efectivos contra *E. histolytica*. Sin embargo, cuando los extractos son incorporados en un sistema nanoparticulado, la CI_{50} disminuye en todos los casos. Estadísticamente presentan diferencia significativa los dos tratamientos contra *T. vaginalis* con las dos plantas (*C. longa* y *B. vulgaris*) cuando se comparan las concentraciones inhibitorias medias del tratamiento del extracto libre con el tratamiento con extracto en NPP.

Wright et al. (2000), obtuvieron una CI_{50} de 41.27 ppm de cloruro de berberina contra *E. histolytica*, a pesar de que trabajaron con un compuesto puro, en el presente trabajo, el extracto crudo de *B. vulgaris*, el cual contiene berberina presumiblemente entre otros alcaloides de la misma familia, se obtuvo una CI_{50} de 34 ppm, lo que significa que el extracto crudo presenta mayor actividad protozoaria comparada con el compuesto activo puro. Lo anterior puede deberse a que existan compuestos activos antiprotozoarios en el extracto crudo además de la berberina o a un sinergismo entre los componentes presentes en los extractos.

Las nanopartículas han sido consideradas poderosas herramientas para el tratamiento de infecciones debido a que éstas son usualmente captadas por las células por endocitosis,

lo cual podría beneficiar la liberación del activo en el caso de infecciones intracelulares. Además, debido a la posibilidad de controlar y prolongar la liberación de las moléculas encapsuladas, las nanopartículas podrían ser muy útiles en la prevención o tratamiento de infecciones (Danhier et al., 2012). En estudios anteriores se han utilizado diferentes tipos de nanopartículas con diferentes activos para mejorar la eficacia del tratamiento de infecciones, por ejemplo, Toti et al., 2011 encapsularon rifampicina y azitromicina en nanopartículas de PLGA. Estudios de captura celular demostraron que las nanopartículas fueron eficientemente concentradas en células infectadas con *Chlamydia*, aumentando la efectividad de los antibióticos al reducir la carga microbiana. Por otro lado, nanopartículas de PLGA cargadas con gentamicina, fueron fagocitadas por monocitos alcanzando el bazo e hígado, órganos diana de la brucelosis (Lecaroz et al., 2006; Lecaroz et al., 2007). Ciprofloxacino también ha sido encapsulado en nanopartículas de PLGA siendo éstas evaluadas in vivo, observando una inhibición efectiva en el crecimiento de *Escherichia coli* debido a las características de liberación sostenida de las nanopartículas (Jeong et al., 2008). Por otro lado, micelas poliméricas cargadas con este antibiótico y recubiertas con PEG-TAT, un péptido activador, fueron capaces de atravesar la BHE, después de ser administradas por vía endovenosa (Liu et al., 2008).

A pesar de que comparando los tratamientos del extracto libre con el extracto en NPP con *E. histolytica* no presentan diferencia estadísticamente significativa, sigue habiendo una disminución de la CI_{50} del extracto en NPP, lo que indica que hay una mejoría en la actividad antiparasitaria. En este caso ya se sabe que el porcentaje de encapsulación de la berberina, el cual es el compuesto activo principal, es mínimo, se piensa que existe otro compuesto o mezcla de compuestos presentes en el extracto que sí pudieron ser encapsulados y son los responsables de dicha actividad.

9. CONCLUSIÓN

El extracto etanólico del rizoma de *C. longa* y el extracto metanólico de la raíz de *B. vulgaris* presentaron actividad antiprotozoaria contra *T. vaginalis* y *E. histolytica*, ambos se muestran mas efectivos contra *E. histolytica*.

Se confirmó la presencia de los compuestos principales activos de los extractos al ser caracterizados parcialmente; el polifenol curcumina en el extracto de *C. longa* y el alcaloide berberina en el extracto de *B. vulgaris*.

Cuando los extractos son incorporados en un sistema nanoparticulado, la CI_{50} disminuye para los dos extractos contra los dos parásitos, sin embargo, solamente para *T. vaginalis* se presentó una diferencia estadísticamente significativa.

Se lograron formular y caracterizar dos sistemas de NPP, uno, incorporando extracto de *C. longa* y otro, incorporando extracto de *B. vulgaris*, presentando las características deseadas de tamaño de partícula, PDI y morfología.

Así mismo, las formulaciones fueron probadas *in vitro* para evaluar su actividad antiprotozoaria con éxito y por ello se convierten en una promesa para mejorar la terapia contra protozoarios a partir de principios activos de origen natural incorporados en sistemas nanoparticulados.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Afzan, M.Y., & Suresh, K. (2012). Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. *Parasitol Res.* 111(1):371–81.
- Aghbashlo, M., Kianmehr, M.H., & Samimi-Akhijahani, H. (2008). *Energ. Convers. Manage.*, 49, p. 2865.
- Allam, G. (2009). Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine *Schistosomiasis mansoni*. *Immunobiology.* 214(8):712–27.
- Amin, A.H., Subbaiah, T.V., & Abbasi, K.M. (1969). Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Can. J. Microbiol.* 15: 1067-1076.
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A., & Aggarwal, B.B. (2007). Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Reviews. Mol. Pharmaceutics.* 4(6):807-818.
- Anand, P., Nair, H.B, Sung, B., Kunnumakkara, A.B, Yadav, V.R. Tekmal, R.R., & Aggarwal, B.B. (2011). Design of Curcumin Loaded PLGA Nanoparticles Formulation with Enhanced Cellular Uptake, and Increased Bioactivity *in vitro* and Superior Bioavailability *in vivo*. NIH Public Access. *Design*, 79(3), 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.09.003>.Design
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., & Svärd, S.G. (2010). Review. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species. *Nat Rev Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro2317
- Azadbakht, M., & Azadbakht, M. (2008). Five prevalent antiprotozoal herbal drugs. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 18(67), 1-15.
- Ballweber, L.R., Xiao, L., Bowman, D.D., Kahn, G., & Cama, V.A. (2010). Review. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol.* 26(4):180-189. doi:10.1016/j.pt.2010.02.005
- Banerjee, A., Qi, J., Gogoi, R., Wong, J., & Mitragotri, S. (2016). Role of Nanoparticle Size, Shape and Surface Chemistry in Oral Drug Delivery HHS Public Access. *J Cont Relea*, 238(805), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.051>

- Barratt, J., Ellis, J., Harkness, J., Marriott, D., & Stark, D. (2013). Evaluation of the *in vitro* Antiprotozoal Activity of Various Dry Plant Extracts against *Dientamoeba fragilis*. *J Infect Dis Ther* 1:111. doi:10.4172/2332-0877.1000111
- Barthelemy, S., Vergnes, L., Moynier, M., et al. (1998). Curcumin and curcumin derivatives inhibit Tat-mediated transactivation of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Res Virol*. 149(1):43–52.
- Borges, P.T., Otaño, B., & Pino, J.A. (2011). Obtención y aplicación de extractos alcohólicos de cúrcuma. *Ciencia Y Tecnologia De Los Alimentos*, 21(3), 68-72.
- Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 631-651.
- Buescher, R., & Yang, L. (2000). Turmeric. In: Lauro GJ, Francis FJ, editors. Natural food colorants. New York: Marcel Dekker.
- Burch, T.A., Rees, C.W., & Reardon, L. (1959). Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* vaginitis. *Am J Obstet Gynecol*. 77(2):309–13.
- Cacciò, S.M., & Sprong, H. (2010). *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol*. 124(1):107-112 doi:10.1016/j.exppara.2009.02.007
- Carlton, J.M., Hirt, R.P., Silva, J.C., Delcher, A.L., Schatz, M., Zhao, Q., et al. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*. 315(5809):207–12.
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC). (2017). *Ciclo biológico de E. histolytica*. Recuperado de <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC). (2017). *Ciclo biológico de T. vaginalis*. Recuperado de <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>
- Cetin, M., Atila, A., & Kadioglu, Y. (2010). Formulation and *in vitro* Characterization of Eudragit®L100 and Eudragit®L100-PLGA Nanoparticles Containing Diclofenac Sodium, 11(3), 1250–1256. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9489-6>
- Ciulei, I., Grigorescu, E., & Stănescu, U. (1993). Plantas medicinales. Fitoquímica y fitoterapia. Farmacognosia, Vol. I, Editura Medicală, Bucuresti, 484-486.

- Connor, T.H., Stoeckel, M., Evrard, J., et al. (1977). Thee contribution of metronidazole and two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated humans and mice. *Cancer Res.* 37(2):629–33.
- Crucitti, T., Jespers, V., Mulenga, C., Khondowe, S., Vandepitte, J., & Buve, A. (2011). Non-sexual transmission of *Trichomonas vaginalis* in adolescent girls attending school in Ndola, Zambia. *PLoS One.* 6(1):e16310.
- Cvetnid, Z., & Vladimir-Kneževic, S. (2004). Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract, *Acta Pharm.*, 54, 243 - 250.
- CYR, B. (2009). United States Patent Application 20090004302.
- Chacko, J., Pramod, K., Sinha, S., et al. (2011). Clinical, neuroimaging and pathological features of 5-nitroimidazole-induced encephalo-neuropathy in two patients: insights into possible pathogenesis. *Neurol India.* 59(5):743–7.
- Chainani-Wu, N. (2003). Safety and anti-inffammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med.* 9(1):161–8.
- Changtam, C., de Koning, H.P., Ibrahim, H., et al. (2010). Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. *Eur J Med Chem.* 45(3):941–56.
- Charles, S.X. (1991). Epidemiology of *Trichomonas vaginalis* in rural adolescent and juvenile children. *J Trop Pediatr.* 37(2):90.
- Cherpes, T.L., Wiesenfeld, H.C., Melan, M.A. et al. (2006). Associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex Trans Dis*, vol. 33, no. 12, pp. 747– 752.
- Chidambaram, M., & Krishnasamy, K. (2014). Codelivery of nanosized curcumin and bioenhancer using acid degradable polymeric nanoparticles displayed enhanced anticancer efficacy. *Nano Biomedicine and Engineering*, 6(2), 1–13. <https://doi.org/10.5101/nbe.v6i2.p47-59>.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Preat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release*, 161, 505-522.
- De Jong, W.H., & Borm, P.J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*, 3, 133- 149.

- Devasena, T., Rajasekaran, K.N., Gunasekaran, G., et al. (2003). Anticarcinogenic effect of bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione a curcumin analog on DMH-induced colon cancer model. *Pharmacol Res.* 47(2):133–40.
- Dulbecco, P., & Savarino, V. (2013). Therapeutic potential of curcumin in digestive diseases. *World J Gastroenterol*; 19(48): 9256-9270. ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online).
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., & Svärd, S. (2016). An update on Giardia and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology.* 34: 47–52.
- Escobedo, A.A., Ballesteros, J., González-Fraile, E., & Almira, P. (2016). A meta-analysis of the efficacy of albendazole compared with tinidazole as treatments for Giardia infections in children. *Acta Tropica.* 153:120–127.
- Fatehi, M., Saleh, T. M., Fatehi-hassanabad, Z., Farrokhfal, K., Jafarzadeh, M., & Davodi, S.J. (2005). *Ethnopharmacol.*, 102, p. 46.
- Fessi, H., Puisieux, F., & Devissaguet, J.P. (1988). Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. *European Patent* 274961 A1, 20 July.
- Freile, M., Giannini, F., Sortino, M., Zamora, M., Juárez, A., Zacchino, S., et al. (2003). Antifungal activity of aqueous extracts and of berberine isolated from *Berberis heterophylla*. *Fitoterapia.* 74(7-8):702-05.
- García, S. (1993). Diagnostic Medical Parasitology. American Society for Microbiology. Washington D.C. p. 84-91.
- Ghys, P.D., Diallo, M.O., Ettiegne-Traore, V., Yeboue, K.M., Gnaore, E., Lorougnon, F., et al. (1995). Genital ulcers associated with human immunodeficiency virus-related immunosuppression in female sex workers in Abidjan, Ivory Coast. *J Infect Dis.* 172(5): 1371-4.
- Gómez-Gaete, C. (2014). Nanopartículas poliméricas: tecnología y aplicaciones farmacéuticas. *Rev. Farmacol. Chile.* 7(2) 7-16.
- Goodman, R.P., Freret, T.S., Kula, T., Geller, A.M., Talkington, M.W., Tang-Fernandez, V., et al. (2011). Clinical isolates of *T. vaginalis* concurrently infected by strains of up to four Trichomonasvirus species (Fam Totiviridae). *J Virol.* 85(9):4258–70.

- Grodstein, F., Goldman, M.B., & Cramer D.W. (1993). Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. *American Journal of Epidemiology*, vol. 137, no. 5, pp. 577–584.
- Grynkiewicz, G., & Slifirski, P. (2012). Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochimica Polonica (ABP)*, 59 (2):201-212.
- Guerrant, R. (1986). The global problema of amebiasis: current status, research needs, and opportunities for progress. *Reviews of Infectious Diseases*, 8:218-227.
- Hadaruga, D.I., Hadaruga, N.G., Bandur, G.N., Ravis, A., Costescu, C., Ordodp, V.L., & Ardelean, A. (2010). *Berberis vulgaris* extract/ β -cyclodextrin nanoparticles synthesis and characterization. *Revista de Chimie*, 61(7), 669–675.
- Han, Y., & Lee, J.H. (2005). Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 28(3):541-44.
- Harp, D.F., & Chowdhury, I. (2011). Trichomoniasis: evaluation to execution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 157(1):3–9.
- Hawksworth, J., Levy, M., Smale, C., Cheung, D., Whittle, A., Longhurst, D., Muir, P., & Gibson, W. (2015). Population structure and genetic diversity of the parasite *Trichomonas vaginalis* in Bristol, UK. *Infect Genet Evol. Jun*, 5;34:36-43. doi:10.1016/j.meegid.2015.06.006.
- Hazra, K., Kumar, R., Sarkar, B.K, Chowdary, Y.A., Devgan, M., & Ramaiah, M. (2015). UV-Visible Spectrophotometric Estimation of Curcumin in Nanoformulation. *International Journal of Drug Development and Research*, 2(3), 375–380. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.2\(3\).127-30](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.2(3).127-30)
- Heinza, E., & Lithgow, T. (2013). Back to basics: A revealing secondary reduction of the mitochondrial protein import pathway in diverse intracellular parasites. *Molecular Cell Research*. 1833(2):295–303
- Hosseini, A., Jaffary, F., Asghari, G.R., Hejazi, S.H., & Bidabadi, L.S. (2012). In Vitro Effects of Turmeric and Licorice Total Extracts on L. Major Promastigotes. *Journal of Isfahan Medical School*, 29(169), 1-11.
- Ionescu, G., Kiehl, R., Wichmann-Kunz, F., Williams, C.H., Bauml, L., & Levine, S. (1990). Oral citrus seed extract. *J Ortho molec Med*. 5:230–238.

- Jarrad, A., Debnath, A., Miyamoto, Y., Hansford, K., Pelingon, R., Butler, M., & Cooper, M. (2016). Nitroimidazole carboxamides as antiparasitic agents targeting *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 120,353-362. doi:10.1016/j.ejmech.2016.04.064
- Jeong, Y.I., Na, H.S., Seo, D.H. et al. (2008). Ciprofloxacin-encapsulated poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. *Int J Pharm*, 352, 317-323.
- Keister, D.B. (1983). Axenic cultivation of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene* 77(4): 487-488.
- Khachane, P., Date, A.A., & Nagarsenker, M.S. (2011). Eudragit EPO nanoparticles: Application in improving therapeutic efficacy and reducing ulcerogenicity of meloxicam on oral administration. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7(4), 590–597. <https://doi.org/10.1166/jbn.2011.1322>
- Khalafalla, R.E., Muller, U., Shahiduzzaman, M., et al. (2011). Effects of curcumin (diferuloylmethane) on *Eimeria tenella* sporozoites *in vitro*. *Parasitol Res*. 108(4):879–86.
- Khoe, S., & Yaghoobian, M. (2009). An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *Eur J Med Chem*, 44(6), 2392–2399.
- Kissinger, P. (2015). *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infect Dis*, 15(1), 1-8. doi:10.1186/s12879-015-1055-0
- Kissinger, P., & Adamski, A. (2013). Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sex Transm Infect*. 89(6):426–33.
- Klebano, M.A., Carey, J.C., Hauth J.C., et al. (2001). Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *New Eng J of Med*, vol. 345, no. 7, pp. 487–493.
- Kolmer, J.A., Spaulding, E.H., & Robinson, H.W. (1951). Methods for testing disinfectants. In: *Approved Laboratory Technique*. New York: Appleton Century Croft, Inc. 599–611.

- Krieger, J.N. (1995). Trichomoniasis in men: old issues and new data. *Sex Trans Dis*; 22(2):83–96.
- Kuriyama, A., Jackson, J.L., Doi, A., et al. (2011). Metronidazole-induced central nervous system toxicity: a systematic review. *Clin Neuropsychopharmacol*. 34(6):241–7.
- Lancheros, R.J., Beleño, J.Á., Guerrero, C.A., & Godoy-Silva, R.D. (2014). Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC). *Universitas Scientiarum*, 19(2), 161–168. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC19-2.pnpm>
- Lecaroz, C., Gamazo, C., & Blanco-Prieto, M.J. (2006). Nanocarriers with gentamicin to treat intracellular pathogens. *J Nanosci Nanotechnol*, 6, 3296-3302.
- Lecaroz, M.C., Blanco-Prieto, M.J., Campanero, M.A., Salman, H. & Gamazo, C. (2007). Poly(D,L-lactide-coglycolide) particles containing gentamicin: pharmacokinetics and pharmacodynamics in *Brucella melitensis*-infected mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 1185- 1190.
- Leitsch, D., Janssen, B.D., Kolarich, D., Johnson, P.J., & Duchêne, M. (2014). *Trichomonas vaginalis* flavin reductase 1 and its role in metronidazole resistance. *Molecular Microbiology*, 91(1), 198-208. doi:10.1111/mmi.12455
- Lemée, V., Zaharia, I., Nevez, G., Rabodonirina, M., Brasseur, P., Ballet J.J., & Favennec L. (2000). Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:819–821.
- Lindmark, D.G., & Muller, M. (1976). Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother.* 10(3):476–82.
- Liu, F., Liang, H.L., Xu, K.H., Tong, L.L., & Tang, B. (2007). *Talanta*, 74, p. 140.
- Liu, L., Venkatraman, S.S., Yang, Y.Y., Guo, K., Lu, J., He, B., Moolchhala, S. & Kan, L. (2008). Polymeric micelles anchored with TAT for delivery of antibiotics across the blood-brain barrier. *Biopolymers*, 90, 617-623.
- Liu, S.M., Brown, D.M., O'Donoghue, P., Upcroft, P., Upcroft, J.A. (2000). Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108:137–140.

- Maiti, K., Mukherjee, K., Gantait, A., Saha, B.P., & Mukherjee, P.K. (2007). Curcumin phospholipid complex: Preparation, therapeutic, evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int J Pharm*, 330(1-2): 155-63.
- Makiuchi, T., & Nozaki, T. (2013). Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie*. pii: S0300-9084(13)00427-6.
- Masoudi, M., Miraj, S., & Rafieian-Kopaei, M. (2016). Comparison of the Effects of *Myrtus Communis L*, *Berberis Vulgaris* and Metronidazole Vaginal Gel alone for the Treatment of Bacterial Vaginosis. *J Clin Diagn Res*, 10(3), QC04-07.
- Mata, C.B.D, Vargas Villarreal, J., González Salazar, F., Palacios Corona, R., & Saíd Fernández, S. (2008). A new vial microassay to screen antiprotozoal drugs. *Pharmacology*, 1: 529-537.
- Mehra, M., Sheorain, J., & Kumari, S. (2016). Synthesis of Berberine Loaded Polymeric Nanoparticles by Central Composite Design. *AIP Conference Proceedings*, 1724(1), 1-6.
- Mehra, M., Sheorain, J., & Kumari, S. (2016). Synthesis of Berberine Loaded Polymeric Nanoparticles by Central Composite Design. *AIP Conference Proceedings*, 1724(1), 1-6. doi:10.1063/1.4945180
- Mimche, P.N., Taramelli, D., & Vivas, L. (2011). The plant-based immunomodulator curcumin as a potential candidate for the development of an adjunctive therapy for cerebral malaria. *Malar J*. 10(Suppl. 1):S10.
- Moghadamtousi, S.Z., Kadir, H.A., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., & Zandi, K. (2014). A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *Biomed Research International*, 1-12. doi:10.1155/2014/186864
- Mohammadzadeh, F., Dolatian, M., Jorjani, M., Majd, H. A., & Borumandnia, N. (2014). Comparing the Therapeutic Effects of Garlic Tablet and Oral Metronidazole on Bacterial Vaginosis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16(7), 1-6. doi:10.5812/ircmj.19118
- Monis, P.T., Caccio, S.M., & Thompson, R.C.A. (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol*. 25(2):93-100.

- Nyindodo-Ogari, L., Schwartzbach, S.D., & Estraña, C.E. (2014). Giardia mitosomal protein import machinery differentially recognizes mitochondrial targeting signals. *Infect Disord Drug Targets*. 14(1):23-9.
- Pasrija, A., Singh, R., & Katiyar, C. K. (2010). Validated HPLC-UV method for the determination of berberine in raw herb Daruharidra (*Berberis aristata* DC), its extract, and in commercially marketed Ayurvedic dosage forms. *International Journal of Ayurveda Research*, 1(4), 243–6. <https://doi.org/10.4103/0974-7788.76789>
- Patra, C.N., Priya, R., Swain S, Kumar, G., Panigrahi, K.C., & Ghose, D. (2017). Pharmaceutical significance of Eudragit: A review, *Future Journal of Pharmaceutical sciences*, doi: 10.1016/j.fjps.2017.02.001.
- Pereira-Neves, A., Ribeiro, K.C., & Benchimol, M. (2003). Pseudocysts in trichomonads—new insights. *Protist*. 154(3–4):313–29.
- Pérez-Arriaga, L., Mendoza-Magaña, M. L., Cortés-Zárate, R., Corona-Rivera, A., Bobadilla-Morales, L., Troyo-Sanromán, R. & Ramírez-Herrera, M. A. (2006). Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites. *Acta Tropica*, 98, 152-161.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., & Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev*. 11(2):300–17.
- Petrin, K., Delgaty, R., Bhatt, & Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microb Rev*, vol. 11, no. 2, pp. 300–317.
- Puisieux, F., Barrat, G., Couarraze, G., Couvreur, P., Devissaguet, J.P., Dubernet, C., Fattal, E., Fessi, H., Vauthier, C., & Benita, S. (1994). Em *Polymeric Biomaterials*; Dumitriu, S., ed.; Marcel Dekker: New York, cap. 16.
- Ralston, K.S., & Petri, W.A. (2011). Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends In Parasitology*, 27(6), 254-263. doi:10.1016/j.pt.2011.02.006
- Ramesh babu, H.N., Thriveni, H.N. & Vasudeva, R. (2012). Influence of drying methods and extraction procedures on the recovery of berberine content in *Coscinium fenestratum*. *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, 2 (4):540-544
- Reyes, H., Navarro, P., Reyes, H. (2003). Amibiasis. Monografía laboratorios Aventis-Pharma Caracas. 28.

- Roney, C., Kulkarni, P., Arora, V., et al. (2005). Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *J Control Release*, 108 (2-3):193-214.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Qinn, M.E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6th ed. USA, Pharmaceutical Press.
- Ryan, U., Cacciò, S.M. (2013). Zoonotic potential of Giardia. Review Article. *Int J Parasitol*. 43(12–13):943-956.
- Said, D., Elsamad, L. & Gohar, Y. (2012). Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-Giardia agents. *Parasitology Research*, 111, 545-554.
- Schmid, G., Narcisi, E., Mosure, D., et al. (2001). Prevalence of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in a gynecology clinic. *J Reprod Med*. 46(6):545–9.
- Schwebke, J.R., & Barrientes, F.J. (2006). Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(12), 4209-4210. doi:10.1128/AAC.00814-06
- Secretaría de Salud. (2017). Boletín Epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. No.38, Vol. 34, Sem 38, 17-23.
- Shabanzadeh, P., Senu, N., Shameli, K., & Ismail, F. (2013). Application of artificial neural network (ann) for prediction diameter of silver nanoparticles biosynthesized in curcuma longa extract. *Digest Journal Of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 8(3), 1133-1144.
- Shahiduzzaman, M., Dyachenko, V., Khalafalla, R.E., et al. (2009). Effects of curcumin on *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Parasitol Res*. 105(4):1155–61.
- Sharma, R.A., Gescher, A.J., & Steward, W.P. (2005). Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*. 41(13):1955–68.
- Sobel, J.D., Ferris, D., Schwebke, J., Nyirjesy, P., Wiesenfeld, H.C., Peipert, J., et al. (2006). Suppressive antibacterial therapy with 0.75% metronidazole vaginal gel to prevent recurrent bacterial vaginosis. *American journal of obstetrics and gynaecology*. 194(5):1283-89.
- Sobel, J.D., Nagappan, V., & Nyirjesy, P. (1999). Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis: an emerging problem. *N. Engl. J. Med*. 341:292–293.

- Soffar, S., Metwali, D., Abdel-Aziz, S., El-Wakil, H., & Saad, G. (2001). Evaluation of the effect of a plant alkaloid (berberine derived from *Berberis aristata*) on *Trichomonas vaginalis* *in vitro*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 31(3):893- 904.
- Sogi, D.S., Sharma, S., Oberoi, D.P.S. & Wani, I.A. (2010). Effect of extraction parameters on curcumin yield from turmeric. *J Food Sci Technol*. 47(3):300–304 DOI: 10.1007/s13197-010-0047-8
- Srivivasan., A., Menon, V.P., Periaswamy, V., et al. (2003). Protection of pancreatic beta-cell by the potential antioxidant bis- o-hydroxycinnamoyl methane, analogue of natural curcuminoid in experimental diabetes. *J Pharm Pharm Sci*. 6(3):327–33.
- Suau, R., Rico, R., Lopez-Romero, J.M., Najera, F., & Cuevas, A. (1998). *Phytochem*. 49, p. 2545
- Sundari, S., Zuprizal, Z., Yuwanta, T., & Martien, R. (2013). Metabolizable energy of ration added with nanocapsule of turmeric extract on broiler chicken. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 38(1), 41-46.
- Thompson, R.C.A., & Ash, A. (2016). Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution*. 40:315-323.
- Tönnesen, H.H. & Karlsen, J. (1985). *Z. Lebensm Unters Forsch*. 180, 132-134.
- Toti, U.S., Guru, B.R., Hali, M., McPharlin, C.M., Wykes, S.M., Panyam, J. & Whittum-Hudson, J.A. (2011). Targeted delivery of antibiotics to intracellular chlamydial infections using PLGA nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 6606-6613.
- United States. Navy Dept. Bureau of Medicine and Surgery. (1953). Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office. 415.
- Upcroft, J.A., Dunn, L.A., Wal, T., Tabrizi, S., Delgadillo-Correa, M.G., Johnson, P.J., Garland, S., Siba, P., & Upcroft, P. (2009). Metronidazole resistance in *Trichomonas vaginalis* from highland women in Papua New Guinea.
- Upcroft, P., & Upcroft, J.A. (2001) Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin. Microbiol. Rev*. 14:150–164.

- Viikki, M., Pukkala, E., Nieminen, P., & Hakama, M. (2000). "Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia," *Acta Oncologica*, vol. 39, no. 1, pp. 71–75.
- Vila-Jato, J.L. (2006). Nanotecnología Farmacéutica: Una galénica emergente. Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España, pp. 15-16.
- Wachter, B., Syrowatka, M., Obwaller, A., & Walochnik, J. (2014). In vitro efficacy of curcumin on *Trichomonas vaginalis*. *Wien Klin Wochenschr*, 126 Suppl 1, S32-36. doi:10.1007/s00508-014-0522-8
- Wei, Q.Y., Chen, W.F., Zhou, B., et al. (2006). Inhibition of lipid per-oxidation and protein oxidation in rat liver mitochondria by curcumin and its analogues. *Biochim Biophys Acta*. 1760(1):70–7.
- WHO, Global Incidence and Prevalence of Selected Curable Sex- ually Transmitted Infections-2008, World Health Organization, Geneva, Switzerland. (2012). http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf.
- Witkin, J.M. & Li, X. (2013). Curcumin, an active constituent [sic] of the ancient medicinal herb *Curcuma longa* L.: some uses and the establishment and biological basis of medical efficacy. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 12(4):1-11.
- World Health Organization (2011). Initiative for Vaccine Research: Parasitic Diseases. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index1.html
- World Health Organization. (1997). *Amoebiasis*. *Wkly Epidemiol Rec*. 72:97-100.
- World Health Organization. (2001). Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overviews and estimates. In: WHO/ HIV_AIDS. Edited by Organization WH. Geneva.
- World Health Organization. (2008). W. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections. 2008. ISBN 978 92 4 150383 9
- Wright, C.W., Marshall, S.J., Russell, P.F., Anderson, M.M., Phillipson, J.D., Kirby, G.C., & Schiff, P.L. (2000). In vitro antiplasmodial, antiamoebic, and cytotoxic activities of some monomeric isoquinoline alkaloids. *J Nat Prod*, 63(12), 1638-1640.

- Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., Valadez, A., Gómez, A., Ramiro, M., & Oswaldo, P. (2011). Novelty on Amoebiasis: A Neglected Tropical Disease. *Journal Of Global Infectious Diseases*, 3(2), 166-174. doi:10.4103/0974-777X.81695
- Yadav, V.S., Mishra, K.P., Singh, D.P., et al. (2005). Immunomodulatory effects of curcumin. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 27(3):485–97.
- Yang, Y., Yang, H.F., Liu, Y.L., Liu, Z.M., Shen, G.L., & Yu, R.Q. (2005). Sensors Actuat. B-Chem., 106, p. 632.
- Yang, Y., Yang, X., Jiao, C.X., Yang, H.F., Liu, Z.M., Shen, G.L., Yu, R.Q. (2004). Anal. Chim. Acta, 513, p. 385.
- Yu, J.S., Wei, F.D., Gao, W., Zhao, C.C. (2002). Spectrochim. Acta a, 58, p. 249.